

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Medicina y Cirugía Animal



TESIS DOCTORAL

Aspectos comparativos entre el cáncer mamario humano y canino con especial referencia al cáncer mamario inflamatorio: grado histológico de malignidad, mecanismos endocrinos e interleucinas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Paloma Jimena de Andrés Gamazo

Directores

Laura Peña Fernández
Juan Carlos Illera del Portal

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Medicina y Cirugía Animal



**ASPECTOS COMPARATIVOS ENTRE EL CÁNCER MAMARIO
HUMANO Y CANINO CON ESPECIAL REFERENCIA AL CÁNCER
MAMARIO INFLAMATORIO:
GRADO HISTOLÓGICO DE MALIGNIDAD, MECANISMOS
ENDOCRINOS E INTERLEUCINAS**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

Paloma Jimena de Andrés Gamazo

Bajo la dirección de los Doctores

Laura Peña Fernández
Juan Carlos Illera del Portal

Madrid, 2015



La Dra. Laura Peña Fernández, con DNI: 00806634-R, Profesora Titular del Dpto. Medicina y Cirugía Animal y el Dr. Juan Carlos Illera del Portal, con DNI: 50418501-V, Catedrático del Dpto. de Fisiología (Fisiología Animal), pertenecientes a la Facultad de Veterinaria de la UCM,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral “**Aspectos comparativos entre el cáncer mamario humano y canino con especial referencia al cáncer mamario inflamatorio: grado histológico de malignidad, mecanismos endocrinos e interleucinas**” realizada por Dña. Paloma Jimena de Andrés Gamazo, se ha llevado a cabo bajo nuestra dirección y que, tras su revisión, consideramos que es apta para ser presentada ante el tribunal calificador.

Madrid, a 15 de septiembre de 2015

Los directores de la Tesis

Fdo. Dra. Laura Peña Fernández

Fdo. Dr. Juan Carlos Illera del Portal

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios de Anatomía Patológica y Fisiología Animal de los Departamentos de Medicina y Cirugía Animal y de Fisiología Animal, respectivamente, de la Facultad de Veterinaria de Madrid. Para su realización la doctoranda ha disfrutado de la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia. Este trabajo se encuadra dentro de los Proyectos de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia (Área de Biomedicina) SAF2005-0355 y SAF2009-10572.

*A mis padres, a Marcos y a mis maravillosas
hijas que iluminan mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Parecía que nunca iba a llegar este momento, pero después de haber completado este arduo trabajo, quiero expresar mi agradecimiento a todos los que creísteis en mí y me apoyasteis en la elaboración de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de Tesis, Laura y Juan Carlos el haberme dado la oportunidad de formar parte de vuestro equipo. Unos jefes respetados y respetables, no sólo porque sean unos magníficos investigadores, sino también por el afecto y respeto con los que me habéis tratado. Gracias por el tiempo y esfuerzo dedicado a lo largo de estos años, gracias por todo lo que me habéis enseñado. Gracias por haberme acompañado durante los grandes acontecimientos de mi vida y gracias por no haber tirado nunca la toalla conmigo. Por eso, al mismo tiempo, creo que os debo una disculpa, disculpas porque esta Tesis se ha retrasado más de lo previsto, y agradecimiento por la paciencia y comprensión que, a pesar de ello, habéis mostrado en todo momento.

También quisiera mostrar un especial agradecimiento a Lola, primera responsable de que me encuentre a las puertas de convertirme en Doctora. Para mí fue un orgullo que tú fueras la primera persona que me introdujera en el mundo de la investigación. Encontrar en este mundo de la ciencia personas con tu calidad humana creo que resulta bastante complicado. Siempre serás para mí un referente y ejemplo a seguir, tanto en el ámbito científico como veterinario. Considero que tu talento y tu capacidad de trabajo te han convertido en una excelente docente, investigadora y tutora. Gracias por estar siempre ahí.

En segundo lugar quiero agradecer a mis padres, gracias por haberme convertido en la persona que soy ahora, por ayudarme en todo lo que he necesitado, por apoyarme y animarme siempre. Gracias por creer en mí y por haberme enseñado a luchar por mis objetivos. A mi madre, por haber sido un ejemplo de superación. Por haber luchado firmemente contra esta enfermedad que estudia mi Tesis y por ser mi ejemplo a seguir. A mi padre, por haber estado siempre a mi lado apoyándome, gracias. Gracias a mis hermanos Carmen y Javi. Porque siempre han cuidado de su hermana pequeña y porque, a pesar de las distancias, nunca dejarán de cuidarme ni de preocuparse por mí. Aunque nunca

os lo digo, espero que jamás hayáis llegado a dudarlo ninguno de los cuatro: Os quiero.

A Mónica, por el ejemplo de esfuerzo y superación que siempre has sido para mí. Por estar ahí siempre que te he necesitado, ya fuera una “inmuno”, una traducción o un simple café para hablar y apoyarnos mutuamente. A Sara, por ser mi fuente de apoyo incondicional y mi amiga. A Ana Vicente, por su ayuda y comprensión, ¡ánimo que ya acabamos! Y por supuesto, a M^a Ángeles, que al principio sólo era la becaria que me enseñó a hacer “inmunos”, pero que poco a poco se fue convirtiendo en una gran amiga y una profesional de renombre con la que sé que siempre puedo contar. Chicas, aunque os tenga a todas lejos, siempre os siento cerca.

A los profesores del Departamento de Medicina y Cirugía, especialmente a Belén y Pilar por acogerme en su despacho como una más. Gracias por haberme apoyado cada día de los 4 años que conviví con vosotras. Gracias por haberme ayudado a ver la luz al final del túnel. Pero sobre todo, gracias por hacerme consciente de que lo que me estaba ocurriendo iba a ser lo mejor de mi vida, en efecto, no os equivocabais. A Rosa, que siempre estuvo disponible para ofrecermme su inestimable ayuda y su sonrisa. A Nines, por ser tan comprensiva con el uso de los reactivos. A las secretarias de nuestro departamento: Laura y M^a José, gracias por ayudarme con todos los papeleos.

A los chicos del laboratorio. A Pedro, gracias por dedicar tanto tiempo y cuidado en el manejo de mis muestras, por tener siempre a tiempo lo que te pedía, por mucho que fuera. A Fernando por el permanente buen humor que transmites y por ayudarme con las técnicas. Al resto de becarias que me acompañaron durante el periodo de realización de las “inmunos”: Irene, Violeta, Carolina y M^a Paz.

A los profesores, PAS y becarios del Departamento de Fisiología, gracias a todos en general por estar siempre ahí para ayudar. A Gema, por estar siempre disponible para mí y por haberme enseñado con suma paciencia, fuese la hora que fuese y costase lo que costase, la realización de las técnicas... ¡cuántos extintores hubo que reponer! A Maria José Illera y Felisbina, por su colaboración

en el proyecto, en general, y en mi trabajo en particular. A Laura, por haber sido mi compañera durante estos años y haberme escuchado siempre. A Leti, Noe, Asun, Sole, Miguel...gracias por haber colaborado en el procesado de mis muestras y por haberos preocupado siempre por mí.

A todo el personal del Hospital Clínico San Carlos sin el que este trabajo no habría sido posible. A los Dres. Juan Antonio Vidart, Jose María Román y Aránzazu Moreno, gracias por vuestra buena disposición a la hora de ceder las muestras. A todas las mujeres que participaron voluntariamente en este estudio, sin vosotras, esto no habría sido posible, gracias.

A Pedro Cuesta, del Centro de Cálculo de la UCM, por su amable disposición y orientación en el estudio estadístico. Gracias por hacerme entender ese desconocido mundo de la estadística.

Al Dr. Reuben, del Departamento de Hematopatología del *University of Texas M.D. Anderson Cancer Center*. Gracias por haberme hecho sentir como en casa esos tres meses y por el ejemplo de esfuerzo y trabajo que siempre me demostraste. Al personal del laboratorio: Hui, Evan, Chang Ping, Yin Dong, Sanda y Michal, gracias por acompañarme en todo momento que duró mi estancia allí.

A mis suegros por haberme ayudado a sacar siempre tiempo para terminar esta Tesis. A mis amigas de siempre y al resto de mi familia, gracias por interesaros en mi trabajo y por escucharme siempre que lo he necesitado. A mi abuela que siempre me ayudó a ser mejor persona.

Y no podría terminar sin agradecer a mis tres amores, Marcos, Cristina y Lucía. Gracias por vuestra comprensión y espero que sepáis perdonarme cada minuto que este trabajo me ha quitado de poder haber estado a vuestro lado. Marcos, quiero agradecerte de verdad que hayas pasado esto conmigo, gracias por haber luchado junto a mí para llegar a este punto. Sin vosotros no soy nada.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. LISTA DE ABREVIATURAS.....	23
II. RESUMEN.....	27
III. SUMMARY.....	35
IV. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	43
1. INTRODUCCIÓN.....	45
1.1. Generalidades del cáncer de mama y del cáncer mamario inflamatorio.....	45
1.2. Factores hormonales que influyen en el riesgo de padecer cáncer de mama.....	50
1.3 Modelos de estudio del cáncer mamario en general y del cáncer mamario inflamatorio.....	53
1.3.1 Líneas celulares.....	54
1.3.2 Modelos experimentales <i>in vivo</i> : ratones.....	58
1.3.3 Modelos espontáneos <i>in vivo</i>	61
a) Primates.....	61
b) Animales domésticos.....	63
2. OBJETIVOS.....	65
V. CAPÍTULO I: Valor pronóstico de la gradación histológica en carcinomas mamarios no inflamatorios en un estudio prospectivo con dos años de seguimiento: relación con las características clínicas e histológicas	67
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	69
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
2.1 Pacientes y procedimientos clínicos.....	73
2.2 Procesamiento de las muestras.....	74
2.3 Seguimiento de las pacientes.....	76

2.4 Análisis estadístico.....	76
3. <i>RESULTADOS</i>	79
3.1 Características epidemiológicas y clínicas.....	79
3.2 Diagnóstico histopatológico, grado histológico de malignidad y seguimiento clínico.....	80
3.3 Asociación entre el grado histológico y las variables epidemiológicas, clínicas e histológicas: análisis univariante.....	80
3.4 Estudio pronóstico.....	81
3.4.1 Análisis univariante de puntos finales de seguimiento clínico y supervivencia.....	81
a) Recidivas/metástasis.....	81
b) Muerte asociada a cáncer mamario.....	82
c) Estudio de supervivencia univariante: curvas de supervivencia de Kaplan-Meier.....	82
d) Estudio de supervivencia multivariante.....	83
VI. CAPÍTULO II: El cáncer mamario canino como modelo para el estudio del cáncer mamario humano: similitudes y diferencias hormonales	85
1. <i>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</i>	87
1.1 Características histopatológicas del cáncer mamario humano y canino.....	87
1.2 Producción de hormonas esteroides en la mujer y en la perra.....	92
1.2.1 Producción de estrógenos en la mujer.....	93
1.2.2 Producción de andrógenos en la mujer.....	94
1.2.3 Producción de estrógenos y progestágenos en la perra.....	95
1.2.4 Producción de andrógenos en la perra.....	95
1.3 Receptores hormonales en tumores mamaros de la especie humana y canina.....	96

1.4 Efecto de las hormonas esteroides a nivel local en la glándula mamaria....	100
1.5 Producción local de hormonas esteroides en la glándula mamaria.....	102
1.6 Contenido de hormonas esteroides en los tumores mamarios.....	106
1.7 Objetivos.....	107
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	107
2.1 Pacientes y procedimientos clínicos.....	107
2.1.1 Especie humana.....	107
2.1.2 Especie canina.....	109
2.2 Procesamiento de muestras.....	110
2.3 Análisis de hormonas esteroides en tejidos.....	110
2.3.1. Establecimiento de las condiciones óptimas de trabajo, tanto de los anticuerpos como de los conjugados.....	111
2.3.2. Desarrollo de la técnica ELISA de competición.....	111
2.3.3. Procesamiento de los resultados obtenidos en el análisis hormonal.....	116
a) Trazado de las curvas patrón.....	116
b) Cálculo de las concentraciones hormonales de las muestras de plasma y tejidos.....	116
2.4 Procesamiento de muestras para histopatología.....	117
2.4.1 Diagnóstico histopatológico y grado histológico de malignidad.....	117
2.4.2 Técnicas inmunohistoquímicas.....	117
a) Detección inmunohistoquímica de RE α	118
b) Detección inmunohistoquímica de RE β	120
c) Detección inmunohistoquímica de RP.....	121
d) Detección inmunohistoquímica de RA.....	121
e) Detección inmunohistoquímica de Aromatasa.....	122
2.4.3 Valoración de las inmunotinciones.....	123
2.5. Análisis estadístico.....	124

3. <i>RESULTADOS</i>	125
3.1. Características epidemiológicas y clínicas.....	125
3.1.1 Especie humana.....	125
3.1.2 Especie canina.....	126
3.2. Diagnóstico histopatológico.....	128
3.2.1 Especie humana.....	128
3.2.2 Especie canina.....	128
3.3. Valoración inmunohistoquímica de aromatasa y receptores hormonales....	128
3.4. Concentraciones hormonales en los homogeneizados tumorales.....	129
3.5. Asociaciones significativas entre los marcadores estudiados.....	130
3.5.1 Asociaciones de aromatasa.....	130
3.5.2 Asociaciones de receptores hormonales.....	130
3.5.3 Asociaciones entre hormonas esteroides en los macerados.....	132
VII. CAPÍTULO III: Incremento de expresión inmunohistoquímica de aromatasa en el cáncer mamario inflamatorio canino: una potencial diana terapéutica	135
1. <i>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</i>	137
1.1. Introducción.....	137
1.2. Características histopatológicas del cáncer mamario inflamatorio.....	138
1.3. Receptores hormonales en el cáncer mamario inflamatorio.....	142
1.4. Objetivos.....	143
2. <i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	144
2.1. Pacientes y procedimientos diagnósticos.....	144
2.2. Estudio inmunohistoquímico de Arom, RE α , RE β y RA.....	146
2.3. Cultivo de líneas celulares IPC-366 y SUM-149; efecto antitumoral de letrozole <i>in vitro</i>	146
2.4. Análisis de viabilidad celular.....	147
2.5. Análisis estadístico.....	147
3. <i>RESULTADOS</i>	148

3.1. Expresión inmunohistoquímica de Arom y receptores hormonales.....	148
3.1.1 Aromatasa.....	148
3.1.2 Receptor de Estrógenos α	149
3.1.3 Receptor de Estrógenos β	149
3.1.4 Receptor de Progesterona.....	149
3.1.5 Receptor de Andrógenos.....	150
3.2. Asociaciones de la inmunotinción de Aromatasa.....	150
3.3. Efecto antitumoral y viabilidad celular de letrozole <i>in vitro</i>	151
VIII. CAPÍTULO IV: Elevación de los niveles de interleucinas 8 y 10 como hallazgos	
característicos del cáncer mamario inflamatorio canino.....	153
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	155
1.1. Las interleucinas en el cáncer mamario humano y canino.....	155
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	158
2.1. Animales y procedimientos clínicos.....	158
2.2. Toma de muestras.....	159
2.3. Histopatología.....	159
2.4. Técnica de detección de interleucinas.....	160
2.4.1. Preparación de las muestras.....	160
2.4.2. Principios de la técnica de detección de interleucinas.....	160
2.4.3. Desarrollo de la técnica de detección de interleucinas.....	161
2.5. Análisis estadístico.....	162
3. RESULTADOS.....	163
3.1. Diagnósticos histopatológicos.....	163
3.2. Niveles de interleucinas en homogeneizados tumorales.....	164
3.3. Niveles séricos de interleucinas.....	164
IX. DISCUSIÓN GENERAL.....	165
1. EL GRADO HISTOLÓGICO DE MALIGNIDAD ADAPTADO A LA ESPECIE CANINA	
COMO FACTOR PRONÓSTICO.....	168

2. COMPARACIÓN DEL CÁNCER MAMARIO CANINO Y EL HUMANO DESDE UN PUNTO DE VISTA HORMONAL.....	173
3. CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER MAMARIO INFLAMATORIO CANINO.....	178
3.1. Aromatasa y receptores hormonales en el CIC. La enzima aromatasa como una potencial diana de tratamiento.....	179
3.2. Elevación de niveles de IL-8 e IL-10.....	183
X. CONCLUSIONES.....	187
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	191
ANEXOS.....	221

ANEXO I: ***Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics***

ANEXO II: ***Canine mammary cancer as a model for human breast cancer: hormonal homologies and differences***

ANEXO III: ***Increased aromatase immunoexpression in canine inflammatory mammary cancer: a potential therapeutic target***

ANEXO IV: ***Increased levels of interleukins 8 and 10 as findings of canine inflammatory mammary cancer***

LISTA DE ABREVIATURAS

I. LISTA DE ABREVIATURAS

Arom- Aromatasa

CDIS- Carcinoma ductal *in situ*

CI- Cáncer inflamatorio mamario

CIC- Cáncer inflamatorio mamario canino

CIH- Cáncer inflamatorio mamario humano

CMH- Cáncer mamario humano

CMH-PM- Cáncer mamario humano en mujeres premenopáusicas

CMH-M- Cáncer mamario humano en mujeres menopáusicas

CMC- Cáncer mamario canino

CMC no CI- Cáncer mamario canino no inflamatorio

DHEA- Dehidroepiandrosterona

E2- 17 β -estradiol

GHM- Grado histológico de malignidad

GM- Glándula mamaria

HCV- Hospital Clínico Veterinario

H-E- Tinción de Hematoxilina-Eosina

HER- Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (*Human epidermal growth factor receptor*)

IL- Interleucina

MN- Mama normal

NOS- *not otherwise specified*

P4- Progesterona

PM- Proliferación mioepitelial

RA- Receptor de andrógenos

RE- Receptor de estrógenos

RP- Receptor de progesterona

SC- Suero control

SCID- Severamente inmunodeprimido (*Severe combined immunodeficient*)

SO4E1- Sulfato de estrona

ST- Supervivencia total

T- Testosterona

TLE- Tiempo libre de enfermedad

TMC- Tumores mamarios caninos

UCM- Universidad Complutense de Madrid

RESUMEN

II. RESUMEN

El cáncer mamario humano (CMH) es un gran problema de salud puesto que es el cáncer que más frecuentemente se diagnostica en la mujer y es la segunda causa de muerte por cáncer. El cáncer mamario inflamatorio (CI) humano y canino (CIH y CIC, respectivamente) es un tipo de cáncer mamario especialmente agresivo de baja prevalencia. El CIC se ha propuesto como modelo para el estudio de la enfermedad humana. El CI se define como una entidad clínicopatológica caracterizada clínicamente por edema difuso, eritema y dolor de la mama, ocupando la mayor parte de la misma y, frecuentemente, sin presentar nódulo mamario, lo que complica el diagnóstico al poder confundirse con una dermatitis o una mastitis. Por otro lado, los tumores mamarios caninos (TMC) se presentan como el primer grupo de tumores en la perra, suponiendo un 52% de todas las neoplasias y el segundo tras los tumores cutáneos teniendo en cuenta ambos sexos. En la especie canina el CI representa el 7,6% de todos los tumores mamarios caninos y el 17% de todas las neoplasias mamarias malignas.

Una gran parte del conocimiento sobre el cáncer mamario humano (CMH) se basa en las investigaciones realizadas *in vitro* o *in vivo*.

En numerosas ocasiones se han propuesto los TMC espontáneos como modelo para el estudio del CMH. Como previamente se ha indicado, se ha demostrado que la perra es un buen modelo animal para el estudio del CIH, ya que tienen características epidemiológicas, clínicas e histológicas similares. Sin embargo, la mayoría de los aspectos comparables en los cánceres de mama de ambas especies, incluyendo el perfil hormonal o la presencia de ciertas citocinas, no han sido todavía evaluados.

Por ello, la presente Tesis Doctoral comprende la realización de cuatro investigaciones relacionadas cuyo objetivo general consiste comparar diversos aspectos entre el cáncer mamario humano y canino con especial referencia al CI mamario.

En primer lugar, se adaptó el sistema de gradación del CMH al cáncer mamario canino (CMC) y se evaluó su valor pronóstico. Se realizó un estudio

prospectivo en el que se incluyeron 65 perras con al menos un tumor maligno y sin metástasis a distancia. Los animales se evaluaron clínicamente, se trataron quirúrgicamente y se realizó un seguimiento posterior de cada animal de al menos 28 meses con un máximo de 38 meses. El diagnóstico histopatológico de los tumores se realizó de acuerdo a la última clasificación de tumores mamarios publicada por Goldschmidt y col. (2011). Según este nuevo sistema de gradación adaptado al cáncer mamario canino, los tumores se clasificaron como grado I (29/65), grado II (19/65) y grado III (17/65). El tamaño del tumor ($p = 0,03$), el estadio clínico ($p < 0,01$), el diagnóstico histológico ($p < 0,01$), la presencia/ausencia de proliferación mioepitelial ($p = 0,005$) y la metástasis en linfonódulos regionales ($p < 0,001$) estuvieron significativamente asociados al grado. En los análisis univariantes, el grado histológico, la edad, el estadio clínico, el subtipo tumoral y la metástasis en los ganglios linfáticos en el momento del diagnóstico estuvieron asociados significativamente al desarrollo de recidivas y/o metástasis ($p < 0,001$; $p = 0,01$; $p = 0,01$; $p < 0,001$; $p = 0,002$, respectivamente), a la muerte asociada al cáncer ($p < 0,001$; $p = 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$, respectivamente), al tiempo libre de enfermedad ($p < 0,001$; $p = 0,009$; $p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$, respectivamente) y a la supervivencia total ($p < 0,001$; $p = 0,006$; $p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$, respectivamente). Se comprobó que una subdivisión del estadio clínico I (T1N0M0) en los estadios IA y IB tiene significación en el pronóstico (estudio univariante). El estadio clínico, el grado histológico y la castración fueron seleccionadas como variables de pronóstico independientes (análisis multivariantes) con el tiempo libre de enfermedad como variable dependiente. Cuando se evaluó la supervivencia total como variable dependiente, el estadio clínico y el grado histológico fueron seleccionadas como covariables independientes en análisis multivariantes. El sistema de clasificación descrito en el Capítulo I es una adaptación a los carcinomas mamarios de la especie canina del sistema numérico utilizado en medicina humana para la gradación histológica conocido como el método de Elston y Ellis. En este estudio se demuestra que el sistema de gradación histológica que hemos adaptado a la especie canina es un factor pronóstico independiente y, por lo tanto, constituye una herramienta útil para predecir el pronóstico, facilita la interpretación clínica de diagnósticos histológicos complicados y ofrece a los patólogos criterios uniformes para la determinación

del grado en áreas de proliferación mioepitelial y en los tumores mixtos. Junto con el grado histológico elevado, el estadio clínico avanzado y la castración son factores pronóstico independientes negativos para la supervivencia de los animales. Por su repercusión en el pronóstico, proponemos una subdivisión del estadio clínico I (T1N0M0) en estadio IA (<1cm) y estadio IB (1-3cm). Además, los estudios comparativos sobre CMC que se realicen en distintos países deberían tener en cuenta la proporción de hembras castradas en la población objeto de estudio ya que podría haber diferencias en el pronóstico.

En segundo lugar, para conocer la validez del CMC como modelo para el estudio del CMH desde un punto de vista hormonal, los objetivos del Capítulo II consistieron en comparar la expresión inmunohistoquímica de aromatasa (Arom) y diversos receptores hormonales [receptor de estrógenos α (RE α), receptor de estrógenos β (RE β), receptor de progesterona (RP) y receptor de andrógenos (RA)], analizar los contenidos intratumorales de varias hormonas esteroides (17 β -estradiol, sulfato de estrona, progesterona, androstenediona, dehidroepiandrosterona y testosterona) y estudiar las posibles asociaciones entre los marcadores anteriormente descritos, utilizando para todo ello muestras de CMH y CMC. Para ello se emplearon 78 muestras de cáncer mamario tomadas prospectivamente [13 muestras de cáncer mamario de mujeres premenopáusicas (CMH-PM), 38 muestras de cáncer mamario de mujeres menopáusicas (CMH-M) y 27 muestras de CMC] y sus correspondientes controles. Se valoró la inmunotinción mediante dos parámetros: el Total Score (TS) determinado por el método Allred y la positividad al receptor (-/+). La tinción de Arom fue similar entre los cánceres humanos y caninos. La expresión del RE α (TS y -/+) fue mayor en el CMH (aunque sólo fue significativa la comparación del grupo CMH-M) que en el CMC, la expresión del RE β (-/+) fue similar en ambas especies y los TS de los RP y RA fueron menores en las muestras de CMC. Las concentraciones de estrógenos, progesterona y andrógenos estaban más elevadas en las muestras tumorales de CMH y CMC respecto a sus controles, pero se hallaron diferencias en las asociaciones entre la expresión de Arom y los receptores y las hormonas analizadas al comparar ambas especies, indicando por tanto unos posibles mecanismos de patogenicidad distintos. En los CMC, los tumores RE α -RP+ se observaron con más frecuencia que en los CMH. En el grupo de CMH, la

inmunoexpresión del RP se asoció con el RE α ($p < 0.001$) mientras que en el grupo de CMC el RP se asoció de forma significativa con el RE β ($p = 0,002$). La expresión inmunohistoquímica de Arom se asoció de forma significativa con el RE α en los CMH ($p = 0.015$) y con el RE β en los CMC ($p = 0.031$). Aunque se ha propuesto el CMC como modelo de estudio del CMH, existen similitudes y diferencias hormonales entre ambos que deberían tenerse en cuenta en estudios comparativos. Se ha visto que ambas especies presentan incrementos intratumorales en todas las hormonas esteroides analizadas y similar expresión de Arom. Sin embargo, el cáncer mamario canino tiene menos porcentaje de tumores positivos al RE α y diferentes asociaciones de algunos receptores que parecen indicar un papel más preponderante del RE β .

Los Capítulos III y IV se han dedicado al estudio de características diferenciales del CIC para profundizar en el estudio del mismo y para conocer su validez como modelo espontáneo de investigación. Las actuales investigaciones sobre las características biológicas del CI en ambas especies humana y canina han conseguido avances significativos en la comprensión del comportamiento tan agresivo de este tipo tumoral y en la búsqueda de moléculas diana para nuevas terapias. El continuo esclarecimiento de moléculas individuales y sus vías relacionadas en el CI no sólo nos proporciona una mayor comprensión de esta enfermedad, sino también puede facilitarnos estrategias terapéuticas únicas.

El tercer capítulo se centró, por un lado, en el estudio de la expresión de la aromatasa y receptores hormonales, analizando posibles diferencias específicas en el CIC y por otro, en investigar los efectos de un inhibidor de aromatasa (letrozole) en el crecimiento de una línea celular de CIC (IPC-366) y otra de CIH (SUM-149). Se comparó la expresión inmunohistoquímica de la enzima Arom y varios receptores hormonales (RA, RE α , RE β y RP) en 21 CIC versus 19 CMC comparables (de grado III, según el sistema de gradación del Capítulo I) no inflamatorios (CMC no CI). En el grupo CIC, se observó una elevación estadísticamente significativa en los TS de Arom, RE β y RP ($p = 0,025$, $p = 0,038$ y $p = 0,037$, respectivamente). Los CIC secundarios expresaron unos niveles mayores de Arom que los CIC primarios ($p = 0,029$). Los CMC no CI que fueron RP- expresaron más cantidad de Arom que los CMC no CI RP+ ($p = 0,007$). Tras

la adición de letrozole en el medio de cultivo de las dos líneas celulares se observó una caída drástica en el número de células de ambas líneas de CI.

El cáncer mamario inflamatorio canino presenta características diferenciales de expresión de la enzima Arom y de receptores de hormonas esteroides respecto a otras neoplasias mamarias malignas comparables de elevado grado de malignidad, lo que apoya la hipótesis emitida previamente de la existencia de un mecanismo endocrino diferente en este tipo especial de cáncer mamario. La sobreexpresión inmunohistoquímica de Arom encontrada en el cáncer inflamatorio mamario canino y la disminución de proliferación de dos líneas celulares triple negativas de cáncer inflamatorio canino (IPC-366) y humano (SUM-149) al ser tratadas con una droga anti-aromatasa (letrozole), indican que la aromatasa podría ser una posible molécula diana a investigar para en el tratamiento de este tipo de cáncer.

El propósito del Capítulo IV fue analizar los niveles de varias interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10) en suero y muestras de tejido tumoral de perras con tumores mamarios benignos y malignos, incluyendo casos de CIC, para lograr un mayor entendimiento de esta enfermedad. Para ello se incluyeron prospectivamente 48 perras (7 perras sanas utilizadas como donantes para las glándulas mamarias normales y los controles serológicos, 10 perras con hiperplasias y tumores mamarios benignos, 24 perras con tumores mamarios malignos no inflamatorios y 7 perras con diagnóstico clínico e histopatológico de CIC) en el estudio. Los niveles de IL-8 en suero ($p < 0,001$) y de IL-10 en suero ($p = 0,043$) y homogeneizado tumoral ($p < 0,001$) estuvieron más elevados en las perras con CIC que en las perras con CMC no inflamatorios. Los niveles de interleucinas se incrementaron con la malignidad tumoral, como se describe a continuación: en los homogeneizados tumorales los niveles de IL-6 fueron más altos en los tumores malignos (CIC y CMC no inflamatorio) en comparación con los tumores benignos y displasias y en comparación con las mamas normales ($p < 0,001$); los niveles tumorales de IL-8 fueron más altos en los tumores mamarios malignos en comparación con la mama normal ($p = 0,005$); los niveles serológicos de IL-1 α ($p = 0,005$) e IL-8 ($p < 0,001$) fueron más elevados en los grupos de malignidad con respecto a los grupos de lesiones benignas y controles. Cabe

destacar que sólo se observó elevación de los niveles serológicos de IL-10 en el grupo de animales con CIC ($p = 0,043$). Nuestros resultados indican que la IL-6, IL-8 e IL-10 tienen un papel específico en la malignidad de los TMC y que las diferencias encontradas en el contenido de ILs en los CIC con respecto a los TMC no inflamatorios podrían tener implicaciones diagnósticas y terapéuticas en el futuro. Parece que las diferencias encontradas en los niveles de IL-8 e IL-10 relacionan a estas ILs con el fenotipo "inflamatorio" y pueden tener un papel importante en este tipo distinto de cáncer de mama. A pesar de que hay pocos datos publicados en relación con los niveles de ILs en CIH, algunos de los resultados de esta Tesis son semejantes a lo previamente publicado. Cabe destacar que los niveles elevados de IL-8 encontrados en el CIC han sido también descritos en el CIH y podrían estar asociados con la exacerbada angiogénesis que caracteriza al CI, puesto que la IL-8 es considerada un estimulante angiogénico. Nuestros resultados indican que las interleucinas IL-6, IL-8 e IL-10 tienen un papel de relevancia en la malignidad de los tumores mamarios caninos. Las diferencias encontradas en el CIC apuntan hacia mecanismos específicos en este tipo de neoplasia que podrían tener implicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Además, las variaciones en el contenido de ILs encontradas en el CIC, semejantes a las descritas en el CIH, apoyan la validez de este modelo natural para el estudio comparativo con la especie humana.

En resumen, los estudios realizados para la elaboración de esta Tesis Doctoral han evaluado diferentes aspectos de los TMC en general y del CI en particular, para dar un verdadero valor a la especie canina como un modelo espontáneo que nos permita estudiar el CMH.

SUMMARY

III. SUMMARY

Nowadays human breast cancer (HBC) is one of the biggest health problems for women worldwide. Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer in women and the second leading cause of death from cancer. Inflammatory breast cancer in women and in female dogs is a particularly aggressive type of breast/mammary cancer with low incidence. Canine inflammatory mammary cancer (IMC) has been proposed as the best natural model to study inflammatory breast cancer. This type of breast cancer is considered a clinical entity in itself, characterized by edema, redness and pain that usually affect the entire breast. It appears very often without a nodule, which makes the diagnosis very difficult, and often mistaken for dermatitis or mastitis. On the other hand, canine mammary cancer (CMC) is presented as the most diagnosed cancer in female dogs, accounting for 52% of all malignancies and the second most common after skin tumors in both sexes. In the canine species IMC represents 7.6% of all canine mammary tumors and 17% of all malignant mammary neoplasms.

A great deal of knowledge about breast cancer is based on research conducted *in vitro* or *in vivo*.

On numerous occasions, spontaneous canine mammary tumors have been proposed as a model for the study of HBC. It has been shown that the canine species is a good model for researching IBC in women because of the very similar epidemiologic, clinical and histological features between the two species. However, most comparable aspects in breast cancers of both species, including the hormonal profile or the presence of certain cytokines, have not yet been evaluated.

Therefore, this Doctoral Thesis comprehends four experiments with the overall objective of comparing diverse aspects of HBC and CMC, with special incidence on inflammatory mammary cancer.

Firstly, the histological grading method of HBC was adapted to the canine species and evaluated as a prognostic indicator in canine mammary carcinomas.

Recruited dogs with at least 1 malignant mammary tumor ($n = 65$) were clinically evaluated, surgically treated, and followed up (minimum follow-up 28 months, maximum 38 months). Histopathological diagnoses were performed according to Goldschmidt *et al.* (2011). According to this new grading system, tumors were graded as grade I (29/65), grade II (19/65), and grade III (17/65). The tumor size ($p = 0.03$), clinical stage ($p < 0.01$), histological diagnosis ($p < 0.01$), presence/absence of myoepithelial proliferation ($p = 0.005$), and regional lymph node metastases at diagnosis ($p < 0.001$) were significantly associated with histological grade. The histological grade, age, clinical stage, tumor subtype group, and lymph node metastases at the time of diagnosis were significantly associated with the development of recurrences and/or metastases ($p < 0.001$; $p = 0.01$; $p = 0.01$; $p < 0.001$; $p = 0.002$; respectively), cancer-associated death ($p < 0.001$; $p = 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$; respectively), disease-free survival ($p < 0.001$; $p = 0.009$; $p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$; respectively) and overall survival ($p < 0.001$; $p = 0.006$; $p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$; respectively) in univariate analyses. A subdivision of clinical stage I (T1N0M0) into stages IA and IB was proposed in terms of prognosis (univariate analyses). The clinical stage, histological grade and spayed status were selected as independent prognostic variables (multivariate analyses) with disease-free survival as the dependent variable. When overall survival was evaluated as a dependent variable, clinical stage and histological grade were selected as the independent covariates in the multivariate analyses. The grading system described in Chapter I is a modification of the widely used human histological grading numeric system known as the Elston and Ellis's method. We have demonstrated that this grading system adapted to the canine species is an independent prognostic indicator, facilitates complicated histological interpretations, and offers uniform criteria to grade areas with myoepithelial proliferation and mixed tumors. Together with high histological grade, the advanced clinical stage and the spayed status are negative independent prognostic indicators for survival. Combining the results of the univariate analyses of the two size systems studied, a subdivision of the modified WHO clinical stage I (T1N0M0) into stage IA (<1 cm) and stage IB (1–3 cm) could be proposed to improve prognosis. Furthermore, comparative studies on CMC performed in different countries should take into account the proportion of spayed

females among the selected dog population and the possible differences in the prognoses.

In second place, in order to test the canine species as a model for HBC from a hormonal point of view, the aims of Chapter II were to investigate the immunohistochemical expression of Aromatase (Arom) and certain steroid receptors [androgen receptor (AR), estrogen receptor α (ER α), estrogen receptor β (ER β) and progesterone receptor (PR)], to study the intratumor steroid hormone levels of 17 β -estradiol, estrone sulphate, progesterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone, and testosterone; and to study the possible associations among the markers studied in HBC and CMC samples. Seventy-eight samples of mammary cancer [13 premenopausal (PM- HBC), 38 menopausal (M-HBC) and 27 CMC] and the corresponding controls were used in this study. Two parameters were used to evaluate immunohistochemical stains: the Allred Total Score (TS) and the positivity for each receptor and Arom (-/+). Arom immunostaining was similar between HBC and CMC. ER α immunoexpression (TS and -/+) was more frequent in HBC (only significant in the comparison of PM-HBC) than in CMC, ER β immunostaining (-/+) was similar in the two species and the scores for PR and AR immunostaining were lower in CMC. Tumor concentrations of estrogens, progesterone and androgens were increased in HBC and CMC respect to their control tissues, but the statistical associations among aromatase, receptors and hormones analyzed differed in the human and canine species, suggesting possible different carcinogenetic mechanisms. CMC had a higher frequency of ER α -/PR+ tumors compared to HBC. In HBC PR expression was associated with ER α ($p < 0.001$) whereas in CMC PR immunoexpression was associated with ER β ($p = 0.002$). Arom immunoexpression was significantly associated with ER α immunolabeling in HBC ($p = 0.015$) and with ER β immunolabeling in CMC ($p = 0.031$). In spite of the fact that CMC has been proposed as a model to study HBC, there are several hormonal similarities and differences between both species that should be taken into account. Cancers of both species showed increased hormonal levels when compared to tissue controls and similar Arom immunoexpressions. However, CMC has fewer ER α + tumors and different associations between some receptors that could possibly indicate a distinct role of ER β in CMC.

Chapter III and IV focused on investigating the differential characteristics of IMC to explore this special type of cancer and to test its value as a spontaneous model for researchers. Current researches on the biologic characteristics of both IBC and IMC have made significant strides in understanding their aggressive behavior, but research is still vital for the development of targeted therapies. Further elucidation of individual molecules and their related pathways in IMC would not only give us a greater understanding of this disease but also may provide us with unique therapeutic strategies.

Chapter III studied, on the one hand, Arom and steroid receptors immunoexpressions in a series of canine inflammatory mammary cancer (IMC) and non inflammatory malignant mammary tumors (grade III), to assess the particularities of the “inflammatory” phenotype and on the other hand, the effects of an aromatase inhibitor (letrozole) in the growth rate of the IMC cell line IPC-366 and the IBC cell line SUM-149. Therefore, the aims of Chapter III were to compare the immunohistochemical expression of the enzyme Arom and several hormone receptors (AR, ER α , ER β and PR) in 21 canine IMC cases versus 19 comparable non-IMC (grade III, according to Chapter I), to study the different associations among Arom and clinical characteristics and other receptors, and the possible effect of letrozole on canine IMC and human inflammatory breast cancer (IBC) *in vitro* using IPC-366 and SUM-149 cell lines. Significant elevations of the means of Arom Total Score (TS), ER β TS and PR TS were found in the IMC group ($p = 0.025$, $p = 0.038$ and $p = 0.037$, respectively). Secondary IMC tumors expressed higher levels of Arom than primary IMC ($p = 0.029$). Non-IMC PR- tumors contained higher levels of Arom than non-IMC PR+ tumors ($p = 0.007$). After the addition of letrozole, the number of IMC and IBC cells dropped drastically.

The different immunoexpressions of Arom and steroid receptors in IMC cases respect to other comparable grade III CMC may support the previously suggested hypothesis of the existence of a different endocrine mechanism in IMC compared to non-IMC. The overexpression of Arom found in the IMC cases and the results obtained *in vitro* after the addition of letrozole in the cell lines culture media, further support future approaches to the treatment of dogs with IMC using Arom inhibitors.

The objective of Chapter IV was to assess levels of several interleukins (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10) in serum and tumors by enzyme-immunoassay in dogs bearing benign and malignant mammary tumors, including dogs with IMC, for a better understanding of this disease. Forty-eight dogs were prospectively included. Animals consisted of 7 healthy Beagles used as donors for normal mammary glands (NMG) and serum controls (SC), 10 dogs with hyperplasias and benign mammary tumors (HBMT), 24 with non-inflammatory canine mammary cancer (non-IMC CMC) and 7 dogs with clinical and pathological IMC. Serum IL-8 ($p < 0.001$) and serum and tissue homogenate IL-10 levels were higher in the dogs with IMC compared with the non-IMC CMC group ($p = 0.043$ and $p < 0.001$, respectively). Interleukins were increased with tumor malignancy as follows: in tumor homogenates IL-6 levels were higher in malignant tumors (IMC and non-IMC CMC) versus HBMT and versus NMG ($p < 0.001$) and tumor IL-8 was increased in malignant tumors versus NMG ($p = 0.005$); in serum, IL-1 α and IL-8 levels were higher in the malignant groups in respect to HBMT and SC ($p = 0.005$ and $p < 0.001$, respectively). Interestingly, IL-10 was elevated only in the serum of IMC animals ($p = 0.043$). Our results indicate a role for IL-6, IL-8 and IL-10 in canine mammary malignancy and specific differences in IL content in IMC versus non-IMC CMC that could have future diagnostic and therapeutic implications. IL-8 and IL-10 have specific difference levels related to the “inflammatory” phenotype and might play important roles in this distinct type of mammary cancer. Despite the fact that there is little data published regarding ILs levels in human IBC, some of the results presented in this Thesis are consistent with previous data. It is important to note that the elevated levels of IL-8 in IMC have been also described in IBC, and could be related to the exacerbated angiogenesis that is characteristic of the “inflammatory” phenotype, given the fact that IL-8 is a potent angiogenic stimulator. Our results indicate that IL-6, IL-8 and IL-10 have a relevant role in CMT malignancy. The differences described in IMC could indicate specific mechanisms in this type of neoplasm that could have therapeutic and diagnostic implications. Furthermore, the similarities found in the variations of some ILs between IMC and IBC, also validate this natural model to investigate IBC.

SUMMARY

In summary, all the experimental procedures involved in this Doctoral Thesis have evaluated general aspects of CMC and the particularities of IMC, to stress the value of the canine species as a model for HBC.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

IV. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del cáncer de mama y del cáncer mamario inflamatorio

El cáncer de mama es el mayor problema de salud en las mujeres de todo el mundo. El concepto de cáncer de mama ha ido variando a lo largo de la historia. Inicialmente era considerado como una enfermedad local, sin embargo, ya en la segunda mitad del siglo XIX se consideraba al cáncer de mama como una enfermedad loco-regional y se pensó que toda intervención curativa debía de pasar por la amplia exéresis de la tumoración, incluyendo los ganglios linfáticos regionales. Hacia los años 60 del siglo XX se comprobó que el 85% de las mujeres que morían por esta enfermedad lo hacían con un buen control locoregional, por lo que se introdujo el concepto de que el cáncer de mama podía ser una enfermedad sistémica desde su descubrimiento (*Escudero Fernández, 2006*).

El cáncer inflamatorio (CI) es un tipo de cáncer de mama especialmente agresivo que está siendo investigado en la actualidad. Se comenzó definiendo con el término carcinoma inflamatorio mamario que es un término clínico que describe un tipo especial de cáncer mamario con diferentes características genéticas, biológicas y clínicas con respecto al resto de los tumores mamarios (*Jaiyesimi y col., 1992, Tavassoli, 1999a, Perez Alenza y col., 2001, Giordano, 2003*). En la actualidad, la descripción de CI más usada procede del *American Joint Committee in Cancer*, que le define como una entidad clínicopatológica caracterizada clínicamente por edema difuso y eritema de la mama, ocupando la mayor parte de la misma y frecuentemente sin presentar nódulo mamario (*Greene y col., 2002*).

El CI fue descrito por primera vez en la mujer en el año 1814 por Charles Bell en su libro *System of Operative Surgery*, quien lo caracterizó como un proceso doloroso y con la presencia de una coloración violácea de la piel sobre la zona del tumor. Desde ese momento el CI ha sido mencionado en la literatura bajo diferentes nombres como “el síndrome de von Volkmann’s”, “mastitis

carcinomatosa”, “carcinoma mamario agudo”, “carcinoma escirro agudo”, “linfocitoma de mama”, “cáncer encefaloide agudo”, “cáncer agudo de la mama”, “carcinomatosis mamaria aguda”, y “cáncer de lactación” (*Klotz, 1869, Von Volkmann y Brust, 1875, Leitch, 1909, Schumann, 1911, Learmont, 1916, Rasch, 1931*). En definitiva, todas estas expresiones indican la existencia de un cáncer mamario agudo y agresivo (*Anderson y col., 2005*). En 1924, Lee y Tannenbaum realizaron el primer estudio exhaustivo de carcinoma inflamatorio donde describieron en 28 pacientes las características de esta forma única de cáncer mamario. Ellos fueron los primeros en introducir el término de “cáncer inflamatorio de mama”, proporcionando además una descripción clínica de la enfermedad. En 1938, Taylor y Meltzer describieron este tipo de neoplasia como una presentación única, agresiva y fatal del cáncer de mama que puede afectar a las mujeres de cualquier edad y de presentación no restringida a la lactación o embarazo. Además, establecieron las dos variedades clínicas principales de esta enfermedad (carcinoma inflamatorio primario y secundario). En definitiva el CIH y el CIC se caracterizan clínicamente por el edema y el eritema de la mama e histológicamente por presentar émbolos tumorales a nivel de los vasos linfáticos de la dermis superficial (*Taylor y Meltzer, 1938, Lee y Tannenbaum, 1924, Tavassoli, 1999a, Pérez-Alenza y col., 2001, Peña y col., 2003a*).

Hoy en día, el cáncer de mama es el cáncer más frecuente en las mujeres y la segunda causa de muerte por cáncer; así, en 2007 el cáncer de mama supuso el 26% de los nuevos diagnósticos de cáncer y el 15% de las muertes producidas por cáncer. Desde 1990 la tasa de mortalidad debida al cáncer mamario ha disminuido en un 24% aproximadamente, habiendo contribuido a esta mejora los programas de detección precoz mediante la realización de mamografías de forma generalizada y el tratamiento adyuvante con quimioterapia y terapias hormonales (*DeVita y col., 2008*). Sin embargo, la incidencia del CI mamario es baja; en la mujer varía entre el 1 y 6% de todos los cánceres mamarios (*Jaiyesimi y col., 1992, Brooks y col., 1998, Chang y col., 1998a, Chang y col., 2000, Wingo y col., 2004*). Estos datos de prevalencia varían geográficamente en los diferentes países (*Hotes y col., 2004*), en el caso concreto de España, el 2,9% de todos los cánceres mamarios humanos diagnosticados entre los años 1977 y 1993 en el Instituto Valenciano de Oncología se

correspondieron con carcinomas inflamatorios mamarios (*Ruiz Simón y col., 2000*). No obstante, la incidencia de CI se ha incrementado, al menos ligeramente, en las últimas tres décadas (*Chang y col., 1998a, Anderson y col., 2003, Anderson y col., 2005, Hance y col., 2005*).

Aunque mucho menos frecuente, el cáncer mamario también puede aparecer en el varón, siendo la incidencia de cáncer de mama en la mujer 100 veces mayor que en el hombre (*Goodman y col., 2006*). Incluso se han descrito casos de carcinoma inflamatorio mamario (*Treves, 1953*). No obstante, el CI es mucho más frecuente en la mujer (1,9%) que en el hombre (0,6%) (*Chang y col., 1998a, Wingo y col., 2004, Goodman y col., 2006*).

En la mujer, la edad media de mayor riesgo de padecer neoplasias mamarias es de alrededor de 60 años. Sin embargo, el CI aparece frecuentemente en mujeres más jóvenes, en torno a los 50 años de edad, generalmente más relacionado con el estado pre o perimenopaúsico, que en mujeres con otras formas de tumor mamario. Se ha observado, además, que la incidencia de CI aumenta hasta los 50 años y luego va descendiendo (*Kokal y col., 1985, Jaiyesimi y col., 1992, Chang y col., 1998a, Wingo y col., 2004, SEER, 2005*).

La incidencia del cáncer de mama en Estados Unidos es algo menor en mujeres de raza negra que en mujeres de raza blanca, aunque los datos tienden a igualarse. Las tasas de mortalidad se mantienen similares, pero destaca el hecho de que la mortalidad ajustada a la edad arroja peores datos en las mujeres de raza negra (*Kovi y col., 1989*). Respecto a los datos consultados en mujeres diagnosticadas de CI, diversos estudios indican una mayor incidencia de los mismos en las mujeres de raza negra (10,1%), con respecto a mujeres de raza blanca (6,2%) o de otras razas diferentes de blanca y negra (5,1%) (*Jaiyesimi y col., 1992, Chang y col., 1998a, Wingo y col., 2004, Hance y col., 2005*).

Los antecedentes familiares de cáncer de mama son uno de los factores de riesgo de mayor peso. Las formas familiares suponen aproximadamente un 20% de todos los cáncer de mama y parece existir una patogenia distinta que depende de los genes implicados en el proceso (*DeVita y col., 2008*). De la misma forma,

se ha indicado que existe un mayor porcentaje de casos de CI que tienen familiares con antecedentes de cáncer mamario, que aquellos que padecen tumor mamario no CI (Chang y col., 1998b; Aziz y col., 2001). En general, el riesgo de desarrollar cáncer de mama para una mujer cuya madre o hermana ha padecido cáncer de mama está incrementado de 1,5 a 3 veces. De todas formas, los antecedentes familiares son un factor de riesgo muy heterogéneo pues hay que tener en cuenta varios factores como el número de familiares que hayan padecido cáncer de mama, la relación exacta, la edad en el momento del diagnóstico y el número de familiares no afectados (DeVita y col., 2008).

La obesidad se considera un factor de riesgo independiente del cáncer de mama. Mientras que en mujeres premenopáusicas obesas se ha visto una reducción del 10% al 30% del riesgo de padecer cáncer de mama, las mujeres posmenopáusicas con un índice de masa corporal superior a 25 kg/m^2 presentan un riesgo relativo de 1.5 a 2 veces mayor que las mujeres posmenopáusicas con un índice de masa corporal inferior a 25 kg/m^2 (DeVita y col., 2008). En el CI, parece existir una asociación entre el índice de masa corporal y la aparición de carcinoma inflamatorio mamario. Cuanto mayor es el índice de masa corporal, existe un mayor riesgo de padecer CI (Chang y col., 1998b, Dawood y col., 2008).

Por último, aunque el cáncer de mama se ha visto tradicionalmente con menor incidencia en los países no industrializados, en las últimas décadas se ha producido un aumento de incidencia en éstas áreas (DeVita y col., 2008). Asimismo se ha asociado una mayor frecuencia de desarrollo de CIH a la vida en zonas rurales, en relación con un menor estatus socioeconómico y con una mayor tendencia a amamantar a los hijos (Maalej y col., 1999, Le y col., 2006).

Por otro lado, los tumores mamarios representan el primer grupo de tumores en la perra, suponiendo un 52% de todas las neoplasias y el segundo tras los tumores cutáneos teniendo en cuenta ambos sexos (Rutteman y col., 2000).

En la especie canina el CI mamario fue descrito por primera vez en 1983 en un estudio clínico y anatomopatológico que incluyó 10 perras con carcinoma inflamatorio mamario (Susaneck y col., 1983). Posteriormente, Pérez-Alenza y col.

(2001) realizaron un trabajo retrospectivo donde se investigaron las características epidemiológicas, clínicas y patológicas en 33 casos de carcinoma inflamatorio canino. Unos años más tarde, este mismo equipo comenzó a publicar diversos estudios sobre este tipo tan especial de cáncer mamario canino (*Illera y col., 2002, Nieto y col., 2002, Peña y col., 2002, Illera y col., 2003b, Peña y col., 2003a, Peña y col., 2003b, Silvan y col., 2003, Sanchez-Archidona y col., 2007, Clemente y col., 2008, Clemente y col., 2009, Clemente y col., 2010a, Camacho y col., 2013, Clemente y col., 2013, de Andrés y col., 2013, Cáceres y col., 2015*). Hasta la aparición de estos estudios, enfocados hacia diversos aspectos como el perfil hormonal, genético e inmunohistoquímico de este tipo de tumor, muy poco se conocía sobre su existencia en la especie canina.

Según un estudio, el CI representa el 7,6% de todos los tumores mamarios caninos y el 17% de todas las neoplasias mamarias malignas (*Pérez-Alenza y col., 2001*). Al igual que en la mujer, la incidencia de CIC ha aumentado en las últimas décadas. Este fenómeno podría deberse a diferentes factores ambientales que influyen en la aparición de CIH, y que podrían también influir en el desarrollo de CI en la especie canina (*Susaneck y col., 1983, Pérez-Alenza y col., 2001, Peña y col., 2003a*).

Los tumores mamarios ocurren casi exclusivamente en las hembras, con presentación ocasional en los machos, siendo la prevalencia de tumores de mama en las hembras 62 veces mayor que en los machos (*Saba y col., 2007*).

La edad media al diagnóstico de los tumores de mama es de 10 años, no siendo frecuente la aparición de una neoplasia mamaria en perras de menos de 4 años (*Rutteman y col., 2000*); no obstante, según un estudio, la media de edad de pacientes con CI es significativamente mayor (11,4 años) que la de aquellos que presentan otros tipos de tumores mamarios malignos diferentes del CI (9,9 años) (*Pérez-Alenza y col., 2001*).

En el estudio de la predisposición racial a padecer neoplasias mamarias se ha observado una incidencia más elevada en las razas Spaniel, Caniche y Dachshunds (*Henson, 2001*) y a diferencia de lo que ocurre en la mujer, no se ha

encontrado predisposición racial a padecer CI en la especie canina (*Pérez-Alenza y col., 2001*).

Por otro lado, *Pérez-Alenza y col., (Pérez-Alenza y col., 2001)* encontraron diferencias significativas en cuanto a la condición corporal, siendo ésta mayor en las perras con CI (frecuentemente delgadas, 43%) que en aquellas con tumores mamarios malignos no carcinoma inflamatorio (generalmente obesas, 40%) (*Pérez-Alenza y col., 2001*), sin embargo estos datos pudieran ser debidos a que el avanzado estado de la enfermedad de las perras con CI las conduce a la pérdida de peso.

1.2. Factores hormonales que influyen en el riesgo de padecer cáncer de mama

El desarrollo de cáncer de mama en la mujer parece estar relacionado con las hormonas reproductivas. Los estudios epidemiológicos han identificado consistentemente los factores de riesgo asociados a un aumento de la exposición a estrógenos endógenos. Así, la edad de menarquia temprana, no haber tenido descendencia, una edad tardía en la primera gestación a término y edad de menopausia tardía son factores que incrementan al doble el riesgo de padecer cáncer de mama (*DeVita y col., 2008*).

La incidencia del cáncer de mama relacionada con la edad aumenta hasta la menopausia. Tras la menopausia, aunque la incidencia continúa aumentado, la tasa de aumento desciende a un sexto de lo observado en el periodo premenopáusico. Se cree que este hecho se produce porque la actividad ovárica juega el papel más importante en la etiología del cáncer de mama. Se ha visto que la menopausia prematura originada por la privación de estrógenos de forma iatrogénica puede reducir el riesgo de desarrollar cáncer mamario. Según diversos estudios epidemiológicos la ovariectomía sin reposición hormonal realizada en mujeres premenopáusicas reduce el riesgo, observándose un marcado incremento en la reducción del riesgo cuanto más temprana se realice la cirugía (*DeVita y col., 2008*). De hecho, la ovariectomía temprana también tiene

un efecto protector en las mujeres con mutaciones en los genes implicados en el cáncer de mama BRCA 1 y 2 (*Trichopoulos y col., 1972*). Respecto al riesgo de padecer CI, algunos estudios apuntan a un mayor riesgo en el periodo perimenopáusico (*Kauff y col., 2002*), otros señalan que es más frecuente en el periodo pre-menopáusico, (*Anderson y col., 2005*) y otros indican mayor prevalencia de CI en el periodo post-menopáusico (*Chiedozi, 1987, Chang y col., 1998b*) o no encuentran diferencias entre ambos periodos (*Mourali y col., 1980*).

La edad de la menarquia está fuertemente ligada al riesgo de cáncer de mama. Parece que existe una reducción de un 20% del riesgo por cada año que se retrasa la menarquia. Es importante remarcar que los niveles hormonales a través de los años reproductivos en las mujeres que tuvieron una menarquia temprana habrían de ser mayores que en aquellas que tuvieron la menarquia a una edad tardía (*Aziz y col., 2001*). Sin embargo, no está muy claro si la edad de la menarquia influye en el riesgo de padecer CI (*Bernstein y Ross, 1993*). Estos datos de la edad de menarquia y de menopausia parecen concluir que lo que realmente afecta al riesgo de padecer cáncer de mama es la total duración de la exposición a los estrógenos endógenos.

La relación entre la gestación y el riesgo de padecer cáncer de mama es más complicada. Basado en estudios epidemiológicos, las mujeres cuyo primer embarazo a término se produjo después de los 30 años de edad tienen un riesgo de 2 a 5 veces mayor de padecer cáncer de mama en comparación con aquellas mujeres que terminaron el primer embarazo a los 18 años (*Anderson y col., 2005*). Las mujeres que no han tenido descendencia tienen un riesgo de aproximadamente 1,4 veces más que las mujeres que han tenido hijos. Sin embargo, el riesgo aumenta transitoriamente después del embarazo. Tras diez años, la gestación se asocia con un efecto protector de mayor duración (*Bernstein y Ross, 1993, Rosner y col., 1994*). La razón por la cual se produce este aumento de riesgo transitorio tras la gestación es la proliferación del tejido mamario que precede la diferenciación justo antes de la lactación. Además, el riesgo podría aumentar de forma secundaria por los efectos de la elevación del nivel de hormonas. El aborto, sea espontáneo o inducido, parece que no aumenta el riesgo (*Rosner y col., 1994*). En un estudio se observó que el 89% de los casos

de tumores mamarios no inflamatorios y el 88% de los casos de CIH se produce en mujeres que han estado alguna vez embarazadas (*Melbye y col., 1997*). Aunque generalmente tener hijos a edad joven protege contra el cáncer mamario (*Chang y col., 1998a*), un estudio determinó que tener el primer parto en edades tempranas predispone a padecer CI (*Levine y Veneroso, 2008*). Otros estudios han demostrado resultados semejantes pues se vio que es tres veces más probable que las pacientes con cáncer mamario agresivo (CI y no CI) hubieran sido madres antes de los 20 años que las pacientes con cáncer mamario no agresivo (*Chang y col., 1998a, Aziz y col., 2001*).

La terapia hormonal sustitutiva (generalmente post-menopáusica) que consiste en el uso combinado de estrógenos y progestágenos también incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama y esto ya se observa tras un periodo relativamente corto de terapia puesto que se observaron mamografías anormales tras un año de terapia hormonal sustitutiva y un incremento de cáncer de mama tras 2 años de tratamiento. Los cánceres de mujeres con estas terapias fueron de mayor tamaño y con mayor frecuencia presentaban metástasis ganglionares o a distancia que en el grupo sin terapia (25,4% vs. 16%) (*Levine, 2004*). En otro estudio se observó que el uso de terapia hormonal sustitutiva estaba asociada a un incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama y un incremento en el riesgo de muerte por cáncer de mama (*Chlebowski y col., 2003*).

En la perra, el desarrollo de neoplasias de la glándula mamaria parece ser también hormonodependiente ya que el riesgo de padecer tumores mamarios aumenta con cada ciclo estral, siendo del 0,5% para las perras esterilizadas antes del primer estro, 8% para las esterilizadas después del primer celo y del 26% para aquellas ovariectomizadas después de 2 o más ciclos. La ovariectomía temprana (antes de los 2 años de edad) es una firme protección contra el desarrollo de tumores mamarios (*Schneider y col., 1969*).

Al igual que en la mujer, la administración exógena de progestágenos influye especialmente en el desarrollo de tumores mamarios caninos, tanto benignos como malignos. Asimismo, los tratamientos con estrógenos utilizados para la interrupción de la gestación también aumentan el riesgo de aparición de tumores mamarios (*Rutteman y col., 2000*). A pesar de este hallazgo, la aparición

de CI no parece estar relacionada con el hecho de haber recibido tratamientos previos con progestágenos para inhibir el celo (*Pérez-Alenza y col., 2001*). Sin embargo, la aparición de CI en la especie canina se asoció con la fase lútea del ciclo estral (*Pérez-Alenza y col., 2001*).

Otras características reproductivas tales como la ovariectomía en edad adulta, el número de gestaciones y la edad del primer parto, las características de los ciclos estrales y la presencia de pseudogestaciones, en la mayoría de los estudios no se asocian significativamente a un peor pronóstico (*Rutteman, 1990, Donnay y col., 1994*). No obstante, la presencia de ciclos estrales de corta duración y de un bajo número de estros por año se ha asociado a un peor pronóstico en algunos estudios (*Else y Hannant, 1979, Hellmen y col., 1993*).

1.3. Modelos de estudio del cáncer mamario en general y del cáncer mamario inflamatorio.

Una gran parte del conocimiento sobre el cáncer de mama se basa en las investigaciones realizadas *in vitro* o *in vivo*.

Los estudios realizados *in vitro* están siendo empleados muy frecuentemente para el estudio de la génesis tumoral y el conocimiento molecular de estas células. Los modelos *in vivo* son muy útiles y necesarios, particularmente para evaluar nuevas estrategias para los tratamientos del cáncer, como la estimulación del sistema inmune o el bloqueo de la cascada metastásica.

Existen numerosos modelos para el estudio de esta fatal enfermedad. En estas páginas hemos realizado una pequeña revisión de los más frecuentes. Existen modelos animales en los que se reproduce intencionadamente la enfermedad, como son los modelos murinos, o existen modelos animales que surgen tras el desarrollo natural de la enfermedad, como sucede en la especie canina. No obstante, tanto en unos como en otros, vamos a encontrar diferencias con la enfermedad que se desarrolla en la especie humana (*Vargo-Gogola y Rosen, 2007*).

Las diferencias que se observan entre los modelos disponibles y la enfermedad en la especie humana suponen un estímulo para la mejora de los modelos, pero también refleja la dificultad inherente en la búsqueda de modelos para el cáncer humano. Los cánceres humanos son genotípicamente, fenotípicamente y con un comportamiento muy heterogéneo (*Allred y Medina, 2008*). Un modelo perfecto debería estar definido molecularmente y ser fenotípicamente consistente. Inevitablemente esto significa que el modelo sólo refleja una pequeña proporción de los cánceres humanos e implica la necesidad de cientos de modelos distintos. Finalmente, el modelo debe coincidir con el experimento. Las precisas preguntas del experimento y los resultados esperados deben ser importantes y realistas para un modelo, pero no para otro (*Horas y col., 2015*).

1.3.1. Líneas celulares

El número de líneas celulares de cáncer mamario disponibles es pequeño, y muy pocas de ellas han sido estudiadas extensamente. Todavía se está cuestionando si estas líneas son representativas del tumor del cual se originaron y si su diversidad refleja la heterogeneidad inter-tumoral existente. Aunque existen numerosas similitudes entre las líneas celulares y los tumores, los avances de las técnicas de análisis, incluyendo el uso de los análisis genéticos, han descubierto nuevos hallazgos en los que hay que profundizar (*Martínez-Carpio, 2003*).

La primera línea celular descrita fue la BT-20, establecida en 1958 (*Lasfargues y Ozzello, 1958*). Desde entonces, y a pesar de que se ha trabajado mucho en esta área, el número de líneas obtenidas ha sido relativamente bajo, alrededor de 100. De hecho, muchos intentos de cultivar células de cáncer mamario partiendo del tumor primario no han sido satisfactorios (*Martínez-Carpio, 2003*). Estos fracasos se deben en parte a que existen muchas dificultades en la extracción de células tumorales viables del estroma circulante. La mayoría de las líneas celulares han sido obtenidas de tumores metastásicos, a partir de efusiones pleurales, ya que éstas contienen gran cantidad de células tumorales viables con muy poca o nada de contaminación de las células del estroma

(Cailleau y col., 1974). Muchas de las líneas que se emplean actualmente fueron obtenidas en la década de los 70 y la mayoría de los estudios que se realizan actualmente parten de un pequeño número de ellas, como la MCF-7 (Soule y col., 1973) o la MDA-MB-231 (Cailleau y col., 1974). El hecho de que los resultados obtenidos en estas investigaciones con un número tan limitado de líneas celulares sean aplicados de forma general a la carcinogénesis es cuestionable (Vargo-Gogola y Rosen, 2007). Las líneas celulares de cáncer de mama más frecuentemente citadas en la literatura científica desde 1990 al 2002 son las siguientes:

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	EDAD AL DIAGNÓSTICO	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	Nº CITAS	RE	RP
BT20	Mama	74	Carcinoma ductal infiltrante	260	-	-
MDA-MB-231	Efusión pleural	51	Adenocarcinoma	1157	-	-
MDA-MB-435	Efusión pleural	31	Carcinoma ductal infiltrante	292	-	-
MDA-MB-468	Efusión pleural	51	Adenocarcinoma	223	-	-
MCF-7	Efusión pleural	69	Carcinoma ductal infiltrante	5774	+	+
SkBr3	Efusión pleural	43	Adenocarcinoma	203	-	-
T47D	Efusión pleural	54	Carcinoma ductal infiltrante	866	+	+
ZR75.1	Líquido ascítico	47	Carcinoma ductal infiltrante	590	+	+

No obstante, las líneas celulares tienen numerosas ventajas, como su fácil manejo y su capacidad de replicación ilimitada. Además, son bastante

homogéneas y pueden ser fácilmente reemplazables a partir de reservas congeladas si se pierden por contaminación (*Holliday y Speirs, 2011*).

Estas líneas celulares pueden ser clasificadas en función de su status frente a los receptores hormonales, en función de los genes que amplifican, en función del origen de obtención o de su capacidad metastásica (*Jones y col., 2000*).

Además, se han obtenido sublíneas celulares a partir de líneas ya establecidas, bien por la obtención de distintas variantes a partir de una línea inestable, bien por el cultivo en diferentes medios. También existen variantes creadas por la selección de subpoblaciones resistentes a determinados agentes como antiestrógenos, doxorrubicina, etc. (*Clarke y Brunner, 1996, Turton y col., 2001*).

En resumen, mas de 33 líneas celulares de cáncer de mama se han establecido partiendo de tumores primarios, tumores metastásicos y efusiones pleurales (*Lacroix y Leclercq, 2004, Neve y col., 2006*).

Las líneas celulares de CIH son, sin embargo, muy escasas. Son las líneas SUM149, SUM 190, MDA-IBC-3, KPL4, WIBC-9 y FC-IBC02 (*Forozan y col., 1999, Van Golen y col., 2000b, Holliday y Speirs, 2011, Fernandez y col., 2013*).

De estas líneas celulares, las más empleadas en estudios de CIH han sido SUM-149 y SUM-190. Ambas derivaron de tumores primarios CI y pueden ser usadas para inducir carcinomas inflamatorios mamarios en ratones inmunodeficientes por transplante. Estas líneas celulares han sido caracterizadas mediante las técnicas de hibridación genómica comparativa y *differential display* con respecto a la expresión de diversos receptores hormonales, de p53 y con respecto a diversas características citogenéticas (*Forozan y col., 1999*). La línea SUM-149 se ha empleado para identificar los determinantes genéticos del fenotipo del CI, habiéndose determinado en ella una sobre-expresión del gen RhoC, que modifica la inducción de factores angiogénicos (*Van Golen y col., 2000b*).

La línea celular de CIH más recientemente descrita es la FC-IBC02, que deriva de una efusión pleural de un CIH secundario metastásico (*Fernandez y col., 2013*). Estas células son triple negativas y forman agrupaciones (mamosferas) en suspensión que son fuertemente positivas a E-cadherina, b-catenina y TSPAN24, todas moléculas de adhesión que juegan un importante papel en la migración e invasión celular. Cuando se inoculan en ratones SCID se desarrollan neoplasias con émbolos tumorales y metástasis ganglionares y pulmonares. Al igual que en medicina humana, los últimos avances en medicina veterinaria han permitido el establecimiento de líneas celulares de TMC como modelos *in vitro* para el estudio del cáncer mamario canino y humano (*Norval y col., 1984a, Hellmen, 1993, Priosoeryanto y col., 1995, Kawabata y col., 2006, Chang y col., 2009, Pawlowski y col., 2009*). Estas líneas celulares han sido obtenidas a partir de los tumores primarios obtenidos tras su escisión quirúrgica y parece que sus perfiles de expresión génica tienen gran semejanza con el tumor primario (*Pawlowski y col., 2009*). Además, estas líneas celulares mostraron resistencia a numerosos fármacos antitumorales como el tamoxifeno o la ciclosporina, por lo que han sido sugeridas como modelo experimental comparativo para el estudio de la génesis tumoral mamaria y de la resistencia farmacológica (*Chang y col., 2009*).

Recientemente nuestro grupo de investigación ha establecido y caracterizado la línea celular de CIC IPC-366. Esta línea celular deriva directamente de un CIC primario. Estas células son triple negativas, sobreexpresan COX-2 y tienen un alto índice de proliferación Ki-67. Tras su inoculación en ratones Balb/SCID, se obtiene un tumor en el 100% de los ratones inoculados. Los ratones desarrollan metástasis ganglionares y pulmonares 4 semanas tras la inoculación. Los tumores que desarrollan los ratones mantienen las mismas características que las de la línea celular IPC-366 (*Cáceres y col., 2015*).

1.3.2 Modelos experimentales *in vivo* ratones

Existen miles de ratones específicamente creados para el estudio de la patología, biología molecular y respuesta a terapias para el cáncer de mama. El éxito de los modelos murinos debe en parte al gran conocimiento de su biología mamaria (en cuanto al desarrollo, cambios por lactación y aparición de tumores espontáneos) y a la cantidad de genes promotores específicos que se han caracterizado, permitiendo la práctica de introducir genes por ingeniería transgénica (Borowsky, 2003). Sin embargo, todavía existen numerosos retos en la validación de los modelos de ratón para el cáncer de mama, como que pocos modelos son representaciones precisas del cáncer de mama positivo a RE o que las metástasis que se dan en algunos modelos son por vía hematógena y se producen en los pulmones exclusivamente, a diferencia de los que ocurre en el cáncer mamario humano (Cardiff y col., 2004).

Para simplificar la clasificación, los modelos pueden ser divididos en dos grupos: los modelos transgénicos, que son aquellos que presentan una expresión de oncogenes específicos ajenos a su genoma, y los modelos de genes dirigidos o *knockouts*, que son organismos modificados genéticamente y carecen de la expresión de un gen en particular, teniendo así una susceptibilidad elevada a la producción de tumores (normalmente por la desactivación de genes supresores) (Fantozzi y Christofori, 2006).

Cientos de ratones transgénicos se han creado para la sobre-expresión de una gran variedad de genes en el epitelio mamario. Los más frecuentemente empleados son los modelos *ErbB2* y *MINO* (modelo para el estudio del CDIS). Estos animales, creados cuando se empezaban a conocer los mecanismos moleculares, han demostrado que el fenotipo tumoral que se da está directamente relacionado con el mecanismo molecular afectado por el transgén, es decir, que el fenotipo es un reflejo del genotipo (Namba y col., 2004).

El tipo de modelo *knockout* más estudiado es el *Tp53 knockout* (Jerry y col., 2000), aunque también se trabaja con otros genes supresores como el *Rb*, *E-Caderina* y los genes del cáncer familiar *BRCA-1* y *BRCA-2* (Moynahan, 2002).

Otra práctica frecuente en la utilización del ratón como modelo para el estudio del cáncer de mama es la de transplantar células mamarias en ratones inmunodeprimidos. El trasplante de tejido normal, hiperplásico, pre-neoplásico o neoplásico permite la evaluación del potencial maligno o metastático, tasas de proliferación, morfología... El uso de estos trasplantes reduce la complejidad que se da en los ratones transgénicos de trazar líneas independientes de los múltiples focos de neoplasia que surgen en estos modelos (*Borowsky, 2003*).

Alpaugh y *col.*, desarrollaron, en el año 1999, un modelo experimental de CIH en ratón denominado MARY-X mediante el trasplante de células tumorales de CIH en ratones severamente inmunodeprimidos (SCID). Se ha comprobado que estos ratones inmunodeficientes xenotransplantados MARY-X han desarrollado émbolos dentro de los vasos sanguíneos y linfáticos y eritema de la piel que recubre la mama, al igual que sucede en los pacientes con CI. Los tumores de los ratones MARY-X son RE-, RP-, p53+ positivo y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) + y HER-2-. El tumor primario que originó MARY-X exhibía idénticos marcadores, excepto que alrededor del 50% de las células amplificaron HER-2. El modelo de ratón xenotransplantado MARY-X se ha utilizado para el estudio de diversas moléculas y sus receptores como integrinas, inmunoglobulinas, factores de crecimiento vascular endotelial, factores de crecimiento fibroblástico, factores de crecimiento transformante y proteasas. Estudiando de manera comparativa el modelo de ratón xenotransplantado MARY-X con los ratones xenotransplantados con tumores mamarios no CI (MDA-MB-231 y MDA-MB-468), dichos autores observaron que sólo había dos moléculas cuya expresión se encontraba incrementada en los tumores del modelo MARY-X (CI) con respecto al de los modelos MDA-MB-231 y MDA-MB-468 (no CI), que eran la E-cadherina y la mucina-1 (MUC-1). Por otro lado, demostraron que sólo la negatividad a los RE y RP, la positividad a p53 y al EGFR no podían ser la causa del fenotipo inflamatorio, porque estos marcadores se expresaban tanto en los ratones xenotransplantados de cáncer inflamatorio como en los de no cáncer inflamatorio (*Alpaugh y col., 1999*).

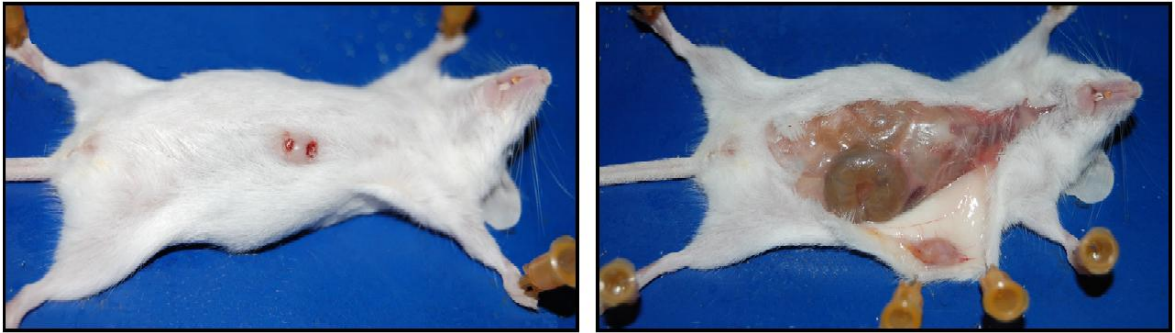
Además, otros autores han desarrollado un xenotrasplante de CIH denominado WIBC-9 empleando ratones SCID y ratones normales (BALB/c). Este

modelo preserva las características biológicas e histológicas del CI mamario y, por tanto, en los ratones WIBC-9 se observan eritema de la piel que recubre la mama, marcada invasión de émbolos linfáticos y una tasa elevada de metástasis pulmonares (*Shirakawa y col., 2001*).

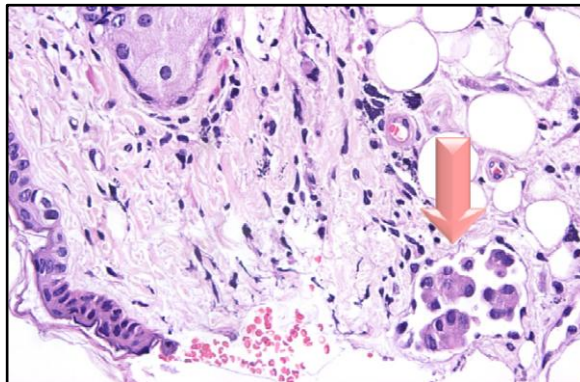
La línea celular que se obtiene de WIBC-9 es aneuploide y presenta una amplificación del gen HER-2, una pérdida de receptores hormonales y un incremento de la expresión de los genes de la interleucina-8 (IL-8). Estudios comparativos de WIBC-9 y otros tres modelos de ratón xenotransplantados no inflamatorios, indicaron sobre-expresión de una serie de genes relacionados con la angiogénesis en el CI, como del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (*Shirakawa y col., 2001*).

Respecto a los modelos de ratón para el estudio de los tumores mamarios caninos (TMC), existen en la bibliografía consultada varios estudios que han obtenido desarrollo de tumores en ratones inmunodeprimidos a partir de líneas celulares obtenidas de TMC (*Norval y col., 1984a, Kawabata y col., 2006, Chang y col., 2009, Gentshev y col., 2009*) y a partir de trasplantes del tumor primario (*Sugimoto y col., 1994, Yamashita y col., 2001*). Estos modelos han sido empleados para observar el comportamiento y las características de los tumores obtenidos (*Norval y col., 1984b, Sugimoto y col., 1994*), así como para estudios de terapias antineoplásicas (*Yamashita y col., 2001, Chang y col., 2009*) e incluso para el estudio de vacunas virales como un posible agente terapéutico frente los TMC (*Gentshev y col., 2009*).

Recientemente nuestro grupo de investigación ha establecido y caracterizado un tumor tipo CIC en ratones inmunodeprimidos a partir de trasplante del CI primario de una perra (*Camacho y col., 2013*). En las siguientes imágenes (cedidas por cortesía de la Dra. Camacho) puede observarse la apariencia clínica del ratón xenotransplantado:



El xenotransplante reprodujo las características histológicas del tumor primario, siendo altamente agresivo y mostrando los émbolos tumorales en la dermis superficial, marcas distintivas del CIC y humano, como muestra la siguiente imagen, cedida por cortesía de la Dra. Peña (la flecha señala un émbolo tumoral en la dermis)(Anderson y col., 2005):



Este modelo fue positivo a receptores hormonales y negativo a HER-2. Se detectó que estos tumores producían estrógenos y andrógenos localmente (Camacho y col., 2013).

1.3.3 Modelos espontáneos in vivo

a) *Primates*

Basándose en la relativa proximidad en la escala de la evolución, los primates son un modelo atractivo para el estudio del cáncer de mama dadas sus semejanzas anatómicas y fisiológicas con los humanos. En lo que respecta al sistema reproductivo femenino, algunas de esas semejanzas incluyen el útero, el ciclo menstrual y las GM pectorales ducto-alveolares lobuladas. La arquitectura

general y la innervación de los conductos y las glándulas es similar a la humana (Kleinberg y col., 1985). Los macacos son los primates mayoritariamente estudiados y de los que más datos se han obtenido en cuanto al aspecto reproductivo. Alcanzan la menarquia de los 3 a los 5 años de edad, tienen una vida media de 25 años y viven un máximo de 40 años. Son muy semejantes genéticamente a los humanos, pero presentan ciclos menstruales estacionales (Roth y col., 2004). La embriogénesis y el desarrollo fetal son muy semejantes a la especie humana, por lo que son empleados como modelos para el desarrollo embrionario. Los cambios hormonales producidos durante el ciclo estral y la menopausia (que suele ocurrir en la mitad de la tercera década de su vida) son semejantes a los ocurridos en las mujeres (Bellino y Wise, 2003).

En general, la prevalencia de las neoplasias en los monos es baja. Además, los tumores mamarios no son frecuentes (alrededor de un 6%) y no están bien caracterizados. No se ha identificado ninguna etiología viral en las neoplasias mamarias (Cohen y col., 2001).

Las lesiones proliferativas de la GM son diversas y se han descrito hiperplasias ductales, CDIS y carcinomas invasivos con extensión a ganglios linfáticos regionales y metástasis a distancia, especialmente pulmonares, morfológicamente similares a las de la especie humana. Las características moleculares de estas neoplasias también se asemejan a las descritas en medicina humana. El marcador de proliferación Ki-67 y la sobre-expresión del oncogén HER-2 se han correlacionado positivamente con el GHM tumoral y, al igual que sucede en el cáncer de mama humano, se percibe una pérdida de receptores hormonales al aumentar el GHM de los carcinomas (Wood y col., 2006).

La utilidad de estos modelos es discutida por la heterogeneidad observada en los monos en comparación con los tumores específicos reproducibles en otros modelos animales como los adenocarcinomas inducidos químicamente en ratones o los tumores mamarios específicos con morfología uniforme en los ratones modificados genéticamente (Cardiff y Wellings, 1999). Además, es importante hacer constar que el mantenimiento de estas colonias supone grandes costes por la alimentación requerida, el espacio que ocupan y la longevidad de estos

animales. Sin embargo, la combinación de las semejanzas filogenéticas y de desarrollo de este grupo de animales así como el comportamiento similar de los tumores mamarios de los primates justificaría un estudio más amplio de este grupo de animales como modelo natural para el estudio del cáncer de mama (Tarara, 2007).

b) Animales domésticos

En general, los tumores mamarios espontáneos caninos y felinos pueden ser empleados como modelo de cáncer mamario humano (MacEwen, 1990, Knapp y Waters, 1997, Vail y MacEwen, 2000, Peña y col., 2003a, Antuofermo y col., 2007). Todos estos estudios que proponen estas especies animales se basan en neoplasias ocurridas de forma natural o espontánea en el animal, y no de forma inducida como ocurre en roedores, lo que les confiere más fiabilidad.

Es importante recordar que los TMC son los más frecuentes en las perras, al igual que en las mujeres (Vail y MacEwen, 2000). Además, tanto las perras como las gatas tienen junto a los tumores mamarios tejido mamario normal y a veces lesiones precancerosas hiperplásicas que pueden darnos información (Meuten, 2002). Se sabe que muchos de los oncogenes y genes supresores de tumores que participan en la patogenia del cáncer mamario humano también participan en el desarrollo del cáncer en estas especies animales (Martín de las Mulas y col., 2003, Dutra y col., 2004, Millanta y col., 2009).

Como los perros y los gatos comparten nuestro medio, sus tejidos podrían servir para el estudio de agentes potencialmente carcinogénicos como los insecticidas, de los que se ha sospechado que puedan ser agentes etiológicos del cáncer de mama (Knapp y Waters, 1997). Además, los perros y los gatos viven mucho más que los roedores, lo que supone una ventaja para la observación de la cinética y progresión del cáncer mamario (Knapp y Waters, 1997).

En ambas especies, como en las mujeres, la exposición prolongada a hormonas esteroides, ya sea endógena o exógena, parece ser el mayor factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama (Munson y Moresco, 2007).

Antuofermo y col. (2007) estudiaron las lesiones intraepiteliales en perras como un modelo para el cáncer de mama humano. Sus resultados preliminares indicaron que la GM canina comparte características similares a la GM humana. Las lesiones intraepiteliales fueron morfológicamente idénticas a las humanas y propusieron un mayor estudio del desarrollo de las calcificaciones en estas lesiones caninas para utilizar a la especie canina como modelo para la detección y seguimiento de las lesiones intraepiteliales, así como un modelo para el estudio de tratamiento del CDIS.

Según muchos autores, los tumores mamarios felinos son más adecuados que los caninos como modelo para el estudio del cáncer mamario humano poco diferenciado ya que la respuesta inflamatoria del hospedador y el patrón de metástasis, incluyendo los huesos, son similares a los descritos en medicina humana. Sin embargo, como se explica a continuación, el CIC es más válido como modelo que el CI felino.

Las especies canina y felina son las únicas especies animales en las que se ha descrito la aparición espontánea de CI. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el perro por Susaneck, y col., en el año 1983 y en el gato por Pérez-Alenza, y col., en el año 2004. En la especie felina, el CI mamario tiene una prevalencia reducida (inferior a la del CIC) y se han descrito CI primarios (*Millanta y col., 2012*) y secundarios (post-quirúrgicos) (*Pérez-Alenza y col., 2004*).

El CI en la especie canina presenta características epidemiológicas, clínicas y patológicas similares a las de la especie humana (*Susaneck y col., 1983, Pérez-Alenza y col., 2001*). La siguiente imagen (cedida por cortesía de la Dra. Pérez-Alenza) muestra las características clínicas del CI mamario en la especie canina:



Sin embargo, por las características del CI mamario felino (baja prevalencia, CI secundario y RE positivo), se considera más apropiado el CIC como modelo de estudio del CIH (*Pérez-Alenza y col., 2004*).

Por la validez del CIC como modelo comparativo con el CIH y por su importancia en la especie canina, nuestro grupo de investigación está realizando diversos estudios, entre los que se encuadra el presente trabajo sobre diferentes aspectos de esta neoplasia tan agresiva.

2. OBJETIVOS

En base a estas consideraciones, la presente Tesis Doctoral comprende la realización de cuatro investigaciones relacionadas cuyo objetivo general consiste en comparar diversos aspectos entre el cáncer mamario humano y canino con especial referencia al cáncer mamario inflamatorio para conocer la validez del cáncer mamario canino como modelo para el estudio del cáncer mamario humano.

Los **objetivos** específicos de estas investigaciones son los siguientes:

- 1) Adaptar el sistema de gradación del cáncer mamario humano al cáncer mamario canino y evaluar su valor pronóstico.
- 2) Comparar la expresión inmunohistoquímica de aromatasa y diversos receptores hormonales [receptor de estrógenos α (RE α), receptor de estrógenos β (RE β), receptor de progesterona (RP) y receptor de andrógenos (RA)], así como analizar los contenidos intratumorales de varias hormonas esteroides (17 β -estradiol, sulfato de estrona, progesterona, androstenediona, dehidroepiandrosterona y testosterona) y estudiar las posibles asociaciones entre los marcadores anteriormente descritos, utilizando para todo ello muestras de cáncer mamario humano y canino.
- 3) Estudiar la expresión inmunohistoquímica de aromatasa y diversos receptores hormonales (RE α , RE β , RP y RA) en muestras de cáncer mamario canino no inflamatorio e inflamatorio, analizando las posibles diferencias específicas en la patogénesis del fenotipo inflamatorio, y evaluar los efectos de una molécula inhibidora de aromatasa (letrozole) en dos líneas celulares, una de CIC (IPC-366) y otra de CIH (SUM-149).
- 4) Analizar los niveles de varias interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10) en suero y muestra de tejido tumoral de perras con tumores mamarios benignos y malignos, incluyendo casos de cáncer inflamatorio, para lograr un mayor entendimiento de esta enfermedad.

CAPÍTULO I

Valor pronóstico de la gradación histológica en carcinomas
mamarios no inflamatorios en un estudio prospectivo con
dos años de seguimiento: relación con las características
clínicas e histológicas

V. CAPÍTULO I

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La diversidad histológica de los TMC hace que su diagnóstico sea muy difícil, y además, proporciona muy poca información de pronóstico. El uso de un método de gradación sería muy útil para poder clasificar los TMC y dar un pronóstico acertado.

En los carcinomas mamarios caninos, se ha empleado el grado de infiltración (*Gilbertson y col., 1983*) para ver su relación con el pronóstico (*Sarli y col., 2002, Sassi y col., 2010*). En el CMH, se han propuesto varios sistemas de gradación de la malignidad tumoral para simplificar la información que proporciona el patólogo al clínico (*Tavassoli, 1999b*). Desde los años 20, han sido numerosos los sistemas creados para establecer grados en los tumores malignos, fundamentalmente evaluando la formación de túbulos. En 1950 Bloom propuso un método que evaluaba tres parámetros: la formación de túbulos, la regularidad en forma, tamaño y tinción nuclear, y la hiperchromasia nuclear y actividad mitótica. Basándose en una evaluación subjetiva de estas características determinó que los tumores podían ser de bajo, moderado o alto grado de malignidad. Evaluó 470 tumores y vio que las tasas de supervivencia a los 5 años eran del 79% para los tumores de grado I y del 25% para aquellos de grado III (*Bloom, 1950a, b*). Años más tarde, Bloom y Richardson decidieron reevaluar el método y para facilitar e intentar unificar los criterios, instauraron un método de puntuaciones (*Bloom y Richardson, 1957*). Tras varios años con otras propuestas de gradación tumoral, Elston y Ellis decidieron modificar el método de Bloom y Richardson (*Elston y Ellis, 1991*). Este método, conocido como método Nottingham, introduce un cambio significativo en lo relativo a la evaluación de la hiperchromasia nuclear y actividad mitótica. Por la dificultad de reconocer la verdadera hiperchromasia y distinguirla de los núcleos picnóticos, decidió eliminarlo de la evaluación, y redefinió el método para contar figuras mitóticas. El método se resume en lo siguiente:

Formación de túbulos;

- 1: más del 75% de los túbulos presentan luz.
- 2: 10-75% de los túbulos con luz, presencia de áreas de crecimiento sólido.
- 3: menos del 10% de los túbulos tienen luz.

Pleomorfismo nuclear;

- 1: presencia de núcleos regulares y uniformes, de pequeño tamaño y con mínimas variaciones.
- 2: moderada variación de la forma y tamaño nuclear, núcleos hipercromáticos, presencia ocasional de nucléolos.
- 3: marcada anisocariosis, núcleos hipercromáticos evidentes, uno o más nucléolos prominentes.

Índice mitótico; se calcula como la suma total de figuras mitóticas observadas en 10 campos de gran aumento (40x), y se cuentan en la periferia del tumor o en las zonas más activas del mismo;

- 1: 0 a 9 mitosis totales.
- 2: 10 a 19 mitosis totales.
- 3: 20 o más mitosis totales.

Sumando los tres números obtenidos en los parámetros anteriores se calcula el GHM, de forma que:

- GHM I= 3-5 puntos. Bien diferenciado.
- GHM II= 6-7 puntos. Moderadamente diferenciado.
- GHM III= 8-9 puntos. Pobremente diferenciado.

A pesar de que este método está sujeto a continuas modificaciones, se ha visto que tiene un importante papel como factor pronóstico. No obstante, la incorporación de otras características tumorales como la presencia de necrosis sería beneficiosa. Uno de los mayores problemas a la hora de emplear los métodos de gradación es la reproducibilidad. Cuando se realiza la evaluación de un tumor, como se valora subjetivamente, deberían obtenerse bajos porcentajes de variación intra e interobservadores independientemente del método empleado, lo que se consigue con uniformidad de criterios y entrenamiento.

En los últimos años, este sistema de gradación se ha empleado para estudiar los TMC (*Peña y col., 1998, Karayannopoulou y col., 2005, Matos y col., 2006, Millanta y col., 2006a, Millanta y col., 2006b, Gama y col., 2008a, Gama y col., 2008b, de Oliveira y col., 2009, Gama y col., 2010, Santos y col., 2010, Hermo y col., 2011, Santos y col., 2011*). Tres de estos estudios (*Peña y col., 1998, Nieto y col., 2000, Karayannopoulou y col., 2005*) evaluaron el significado pronóstico de este método de gradación humano en el cáncer mamario canino, demostrando su valor predictivo en un análisis univariante (*Peña y col., 1998, Karayannopoulou y col., 2005*). Sin embargo, este método no es un indicador pronóstico independiente cuando se emplea en análisis de pronóstico multivariantes (*Peña y col., 1998, Nieto y col., 2000*). Lo que es más, los TMC poseen diversas características específicas que requieren la adaptación de un sistema para esta especie, como son:

- De los TMC malignos, una baja proporción metastatizan (*Benjamin y col., 1999, Lana y col., 2007, Clemente y col., 2010b*). Por ello sería necesario desarrollar un sistema de gradación que discrimine entre los tumores que potencialmente podrían recidivar o metastatizar.
- Los tumores complejos y mixtos se dan con mucha frecuencia (*Goldschmidt y col., 2011*). El método Nottingham no tiene en cuenta la proliferación mioepitelial o las áreas mesenquimatosas. Es esencial emplear criterios uniformes para evaluar estas zonas cuando se establece el grado en las neoplasias complejas o mixtas.

- Existen criterios de malignidad específicos de los TMC (*Goldschmidt y col., 2011*). El pleomorfismo nuclear conduce con frecuencia a diagnosticar en exceso características de malignidad, incluso en tumores benignos.

Existen dos sistemas numéricos de gradación adaptados a los TMC que son modificaciones del método empleado en medicina humana y que difieren ligeramente (*Goldschmidt y col., 2011*): el método de Misdorp (*Misdorp, 2002*) y el método de Peña (*Clemente y col., 2010a*). De acuerdo con una publicación sobre clasificación y gradación de los tumores mamarios caninos, para poder separar las neoplasias malignas en categorías con un desenlace clínico significativo es necesario realizar estudios prospectivos y retrospectivos (*Goldschmidt y col., 2011*). Hace unos años se publicó un estudio retrospectivo que comparaba estos dos métodos de gradación (Misdorp y Peña) en una gran serie de casos de TMC malignos (*Rasotto y col., 2012*). Este estudio comprobó que ambos métodos de gradación histológica son predictores significativos ($p < 0,001$) del riesgo de invasión linfática y de la existencia de metástasis en los linfonodos regionales en el momento del diagnóstico. Sin embargo, el método de Peña (publicado parcialmente como Clemente y col.) (*Clemente y col., 2010a*) demostró tener una mejor capacidad predictiva.

El presente estudio es un estudio prospectivo en el que se describe completamente el método de Peña de gradación histológica de los TMC malignos y lo evalúa como indicador pronóstico siguiendo las recomendaciones para la realización y evaluación de estudios de pronóstico en estudios de oncología veterinaria (*Webster y col., 2011*).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Pacientes y procedimientos clínicos

En este estudio prospectivo se han incluido 65 perras que acudieron a la consulta de Oncología Mamaria del HCV de la UCM a lo largo de un año y que fueron diagnosticadas de al menos una lesión de cáncer mamario canino (CMC).

En todos los casos se llevó a cabo un protocolo de evaluación clínica de animales con tumores de mama que se utiliza de forma rutinaria en dicha y que ha sido publicado previamente (*Pérez-Alenza y col., 1997*). Se anotan los datos referentes a la edad, raza, sexo (castrada/no castrada), peso del animal, regularidad de celos y/o anormalidades de los mismos y administración de tratamientos hormonales. Posteriormente, se lleva a cabo un examen físico general y una exploración detallada de todas las glándulas mamarias y ganglios regionales. Por último, se realizan técnicas de diagnóstico por imagen (radiología y/o ecografía) para detectar la posible existencia de metástasis.

Una vez que las perras fueron examinadas y se evaluaron los tumores mamarios registrando todas sus características (localización, tamaño en centímetros, adherencia a piel, adherencia a los tejidos subyacentes y ulceración), se realizó una clasificación clínica de las pacientes. Para clasificar el estadio tumoral de los animales se empleó el sistema TNM de la OMS modificado (*Lana y col., 2007*), que clasifica a los animales en V estadios diferentes teniendo en cuenta el tamaño tumoral (T_1 si el tumor es inferior a 3 cm, T_2 si el tumor mide entre 3 y 5 cm y T_3 si el tumor mide más de 5 cm en su mayor diámetro), la presencia de metástasis en linfonodos regionales (N_0 si no hay metástasis y N_1 indica la presencia de metástasis) y la presencia de metástasis a distancia (M_0 si no hay metástasis y M_1 indica la presencia de metástasis a distancia):

- Estadio I ($T_1N_0M_0$)
- Estadio II ($T_2N_0M_0$)
- Estadio II ($T_3N_0M_0$)

- Estadio IV ($T_{\text{cualquiera}}N_1M_0$)
- Estadio V ($T_{\text{cualquiera}}N_{\text{cualquiera}}M_1$)

Los animales se incluyeron en nuestro estudio solo si estaban en los estadios I, II, III o IV en el momento del diagnóstico y se trataron quirúrgicamente. Las perras que presentaron sarcoma mamario, carcinosarcoma, cáncer mamario inflamatorio o metástasis a distancia (estadio V) fueron excluidas del estudio.

Tras la clasificación clínica de las pacientes, se procedió a realizar una cirugía mamaria para extirpar los nódulos mamarios. Distintas cirugías se llevaron a cabo en función del número y localización de los tumores en las cadenas mamarias y del estadio clínico: nodulectomía, mastectomía simple, mastectomía regional o mastectomía unilateral completa. Se realizó ovariectomía a todas las perras enteras en la intervención de mastectomía. El diagnóstico de los tumores mamarios se obtuvo mediante estudio histopatológico de las muestras quirúrgicas.

Sólo fueron incluidas en este estudio las perras que tras el tratamiento quirúrgico de los tumores mamarios no recibieron quimioterapia adyuvante después de la cirugía.

Este estudio fue realizado con la aprobación del Comité de Ética en Experimentación Animal de la UCM y con el consentimiento firmado de todos los propietarios de las perras.

2.2. Procesamiento de muestras

Tras la resección quirúrgica de los tumores, cada mama fue identificada y procesada individualmente. Los tumores obtenidos permanecieron en formol tamponado comercial al 10% durante un mínimo de 24 horas a temperatura ambiente para su fijación. Las muestras se tallaron, tomando una muestra representativa de la neoplasia y se evitaron las zonas de necrosis. Cada pieza se colocó en un casete y se incluyó en parafina sintética mediante el uso de un

procesador automático de tejidos Shandon-Elliot (modelo Bench SCE 0400). En ese proceso, los casetes se pasan automáticamente por una serie de alcoholes y bencenos para la eliminación del formol, deshidratación y la posterior inclusión en parafina sintética (*Histosec®* pastillas Merck) a 56 y 57°. A continuación, se realizaron los bloques de tejidos en parafina utilizando una unidad formadora, consola *Tissue-Teck®* (dispensador de parafina, consola térmica y crioconsola de *Miles Scientific®*).

A partir de los bloques se obtuvieron secciones de tejido en parafina de 3 µm de grosor mediante un microtomo de rotación (modelo JUNG RM 2155 de *Leica®*). Para su tinción con hematoxilina y eosina (H-E) las secciones se desparafinaron en xilol y siguieron un proceso de hidratación pasando por una serie de alcoholes de graduación decreciente hasta el agua. La deshidratación tras la tinción se realizó de forma inversa, pasando por una serie de alcoholes de graduación creciente y xilol. Las preparaciones se montaron con un medio DPX (*Surgipath®*) y cubreobjetos. Por último, se realizó un diagnóstico histopatológico en el Servicio de Anatomía Patológica del HCV de la UCM de todas los tumores de cada animal empleando la última clasificación para tumores mamarios caninos (*Goldschmidt y col., 2011*). Esta clasificación incluye 5 nuevos subtipos morfológicos en los CMC en comparación con la previa clasificación publicada por la Organización Mundial de la Salud (*Misdorp y col., 1999*): carcinoma micropapilar invasivo, comedocarcinoma, carcinoma ductal, carcinoma intraductal papilar y carcinoma y mioepitelioma maligno.

El grado histológico de malignidad tumoral fue determinado como se indica en la Tabla 1 del Anexo I que detalla el método de gradación de Peña para CMC completo. Esta adaptación a la especie canina del sistema de gradación tumoral utilizado en medicina humana (*Elston y Ellis, 1991*) considera la heterogeneidad de los CMC, marca cómo evaluar las áreas de proliferación mioepitelial y las neoplasias mixtas y modifica la evaluación de las variaciones nucleares.

Así, en los CMC heterogéneos, la puntuación de las formaciones tubulares se determina en el área maligna más representativa. En los tumores complejos y mixtos, la puntuación de las formaciones tubulares se otorga considerando sólo las zonas epiteliales y el pleomorfismo nuclear se evalúa en todos los

componentes celulares malignos. Los tumores se clasificaron como grado I, grado II y grado III (Figs. 1 a 6 del Anexo I). Debido a la incapacidad de este sistema de establecer un grado para los sarcomas, las perras con sarcomas mamarios y carcinosarcomas fueron excluidas del estudio. Se registró en cada caso la presencia o ausencia de proliferación mioepitelial (PM).

2.3. Seguimiento de las pacientes

Tras la escisión quirúrgica de los tumores, se realizó un seguimiento de los animales cada 4-6 meses durante al menos 28 meses (periodo máximo de seguimiento 38 meses). Cada revisión incluyó una historia clínica completa, examen físico completo, evaluación de las glándulas mamarias, evaluación de los linfonodos regionales y examen radiológico del tórax (al menos 2 proyecciones). Se determinó el desenlace clínico considerando el desarrollo de recidivas locales, metástasis a distancia o muerte asociada al cáncer como puntos finales. La recidiva local se definió como el desarrollo de un nuevo CMC en el mismo lugar que el cáncer inicial. Se calcularon el tiempo libre de enfermedad (TLE, tiempo transcurrido desde la cirugía hasta el desarrollo de recidivas y/o metástasis) y la supervivencia total (ST, tiempo transcurrido desde la cirugía hasta la muerte a causa del cáncer o final de seguimiento) en cada paciente. Los seguimientos fueron finalizados por alguna de las siguientes causas: (a) muerte a causa del cáncer, (b) muerte por otras causas, (c) cese voluntario de las revisiones (todas las perras tienen un mínimo de 28 meses de seguimiento) y (d) fin del estudio (38 meses). En el estudio de supervivencia, se censuraron los casos cuyo seguimiento finalizó por las causas b, c y d.

2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el apoyo del Centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid, mediante el empleo del programa estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, IL, USA) versión 19.0 para *Windows*.

En los animales con más de un tumor maligno, se seleccionó el tumor más maligno desde el punto de vista histopatológico y clínico para el análisis estadístico (*Misdorp, 2002*).

Se incluyeron en el estudio estadístico variables epidemiológicas, clínicas, histopatológicas y de seguimiento. Se analizaron las siguientes variables epidemiológicas y clínicas: edad (años), raza (razas grandes de peso igual o superior a 20kg y razas pequeñas de peso inferior a 20kg), tratamientos hormonales previos para la prevención del celo (no/sí), regularidad de los celos (no/sí), número de tumores malignos por animal, localización de los tumores (en la categoría craneal se incluyeron las mamas torácicas y las abdominales craneales y en la categoría caudal se incluyeron las mamas abdominales caudales y las inguinales) y el tamaño tumoral. Para el análisis estadístico, el tamaño tumoral se determinó utilizando las 3 siguientes variables: (a) variable numérica (tamaño en centímetros), (b) tamaño siguiendo las indicaciones de la Organización Mundial de la Salud (*Owen, 1980, Lana y col., 2007*) ($T_1 < 3$ cm, $T_2 = 3-5$ cm y $T_3 > 5$ cm) y una nueva variable de tamaño tumoral que establece 3 categorías (tumor de pequeño tamaño si el tumor mide menos de 1 cm, tumor de tamaño medio si el tumor mide entre 1 cm y 2,9 cm, y tumor grande si el tumor mide 3 cm o más). Esta última variable de tamaño se empleó para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en los tumores categorizados como menores de 3 cm. Las siguientes variables también fueron incluidas en el análisis estadístico: ulceración de la piel (no/sí), adherencia a la piel (no/sí), adherencia a los tejidos subyacentes (no/sí), estadio clínico y tipo de cirugía (nodulectomía, mastectomía simple, mastectomía regional y mastectomía completa). Además del diagnóstico histológico, algunos subtipos tumorales se agruparon en 3 categorías histológicas para la evaluación estadística basándose en características morfológicas y comportamiento biológico (de acuerdo a la experiencia previa del patólogo y a otros estudios (*Misdorp y col., 1999, Misdorp, 2002*)). Este tipo de agrupación generó una nueva variable histológica denominada HD3. La variable HD3 se dividió en tres grupos distintos como se explica a continuación: grupo 1, que incluyó el carcinoma *in situ*, carcinoma simple, carcinoma que aparece en tumor mixto, carcinoma complejo, carcinoma de tipo mixto, carcinoma ductal y carcinoma adenoescamoso; grupo 2, que incluyó el

carcinoma sólido, comedocarcinoma, carcinoma y mioepitelioma maligno y carcinoma anaplásico; y el grupo 3, que incluyó otros tipos histológicos. El grado histológico de malignidad (I, II o III) y la presencia evidente de proliferación de células mioepiteliales (PM) (no/sí) se incluyeron como otras variables histológicas. Las variables de seguimiento que se analizaron fueron: desarrollo de recidiva y/o metástasis (no/sí), TLE (meses) y ST (meses).

Se emplearon curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el TLE y la ST. Para evaluar la influencia conjunta de diversas variables agrupadas (factores de riesgo, llamadas covariantes) en las variables de seguimiento (TLE y ST) se realizaron análisis de regresión empleando el modelo de riesgos proporcionales multivariante de Cox (Regresión de Cox). Mientras que el estimador de Kaplan-Meier con el test log-rank es útil para comparar las curvas de supervivencia en 2 o más grupos, la regresión de Cox permite el análisis del efecto combinado de varios factores de riesgo (pronóstico) sobre la supervivencia.

La probabilidad de alcanzar el punto final (recidiva/metástasis o muerte asociada al cáncer) se denomina riesgo. El índice de riesgo (*Hazard Ratio*, RR) se calcula con la siguiente fórmula: $RR = \exp(\beta_1 X_1 + \dots + \beta_n X_n)$; donde β_1, \dots, β_n , estimados por la regresión de Cox, son los coeficientes que afectan las agrupaciones de las variables relacionadas (covariantes, factores de riesgo) incluidas en el modelo (X_1, X_2, \dots, X_n). Las covariantes dicotómicas se codificaron como 1 si la característica estaba presente y 0 si estaba ausente. En variables con 3 y 4 categorías (grado histológico y estadio clínico, respectivamente), el sistema las transformó en variables dicotómicas (estadios clínicos A, B y C, y grados histológicos A y B) (La tabla 2 del Anexo I incluye más información). $\exp(\beta_n)$ representa el riesgo relativo instantáneo de un evento en cualquier momento para un individuo con el factor de riesgo presente en comparación con un individuo con el factor de riesgo ausente, cuando las otras covariantes se mantienen constantes. En el presente modelo de regresión de Cox, las covariantes se seleccionan de acuerdo al método *forward*: las variables independientes entran en el sistema secuencialmente en varios pasos de acuerdo a su significación estadística. Esas variables que fueron significativas en un paso

determinado del análisis, se consideran constantes para la evaluación del efecto combinado de las otras variables en las variables dependientes.

Las asociaciones fueron consideradas significativas para los valores de $p < 0,05$. Sólo se utilizaron en el análisis estadístico los animales que presentaban todos los datos completos de todas las variables estudiadas.

3. RESULTADOS

3.1. Características epidemiológicas y clínicas

Se incluyeron en este estudio 65 perras con edades comprendidas entre 3 y 15 años (edad media 9,68 años), tanto enteras ($n = 52$) como castradas al menos 4 años antes de la presentación de los tumores ($n = 13$). Las perras eran tanto de razas puras (19 razas diferentes) como mestizas; según su tamaño se consideraron pequeñas ($n = 38$) y grandes ($n = 27$). Cuarenta y seis de las 65 perras (70,76%) presentaron 1 tumor maligno, 13 animales (20,00%) tenían dos tumores malignos y 6 perras (9,23%) tenían 3 o más tumores malignos. Además, 50 de los 65 animales (76,92%) presentaron otras neoplasias mamarias benignas y/o displasias: 10 de los 65 animales estudiados (15,38%) tenían neoplasias benignas, 24 animales presentaron displasias (36,92%) y 16 (24,61%) tenían ambos (tumores benignos y displasias).

El tamaño de los tumores varió entre 0,5 a 14 cm ($n = 65$; media = 2,2 cm). Según la OMS, las neoplasias se clasificaron por su tamaño en: 45 neoplasias T_1 (<3cm), 15 T_2 (3-5 cm) y 5 T_3 (>5cm). Cuando se empleó la variable adicional de tamaño tumoral utilizada en este estudio, los tumores se distribuyeron de la siguiente forma: 20 de pequeño tamaño (<1 cm), 25 de tamaño medio (1-2,9 cm) y 20 de gran tamaño (≥ 3 cm). Con respecto a la clasificación clínica de los animales en el momento del diagnóstico, 42 perras (64,61%) presentaban un estadio I, 11 animales (16,92%) estadio II, 5 animales (7,69%) estadio III y los restantes 7 animales (10,76%) estadio IV.

3.2. Diagnóstico histopatológico, grado histológico de malignidad y seguimiento clínico

Los diagnósticos histopatológicos de los tumores se muestran en la Tabla 3 del Anexo I. Se detectó proliferación mioepitelial (PM) en 25 de las 65 perras (38,46%). Los tumores se distribuyeron de acuerdo al grado histológico de malignidad como se detalla a continuación: grado I (29/65; 44,61%), grado II (19/65; 29,23%) y grado III (17/65; 26,15%).

Durante el seguimiento de las pacientes tras la intervención quirúrgica (28-38 meses), 14 animales (14/65; 21,53%) desarrollaron recidivas y/o metástasis; de esos 14 animales, 3 desarrollaron solo recidivas, 6 solo metástasis y 5 animales desarrollaron recidivas y metástasis. De las 65 perras incluidas en el estudio, 13 (13/65; 20,00%) murieron como consecuencia del cáncer mamario.

3.3. Asociación entre el grado histológico y las variables epidemiológicas, clínicas e histológicas: análisis univariante

Ninguna de las variables epidemiológicas o reproductivas estudiadas se relacionó de forma significativa con el grado histológico. No obstante, tanto el estadio clínico ($p < 0,01$) como el tamaño tumoral (<1 cm, 1-2,9 cm, y >3 cm; $p = 0,03$) se asociaron con el grado histológico. Todos los animales, excepto uno, con neoplasias de grado I presentaban estadios clínicos I y II; además, los tumores de grado III eran de un tamaño tumoral significativamente mayor los tumores de grado I. El tamaño categorizado según la OMS no se asoció de forma significativa al grado histológico ($p = 0,06$).

El diagnóstico histológico y el grado se asociaron de forma significativa ($p < 0,01$). Todos los comedocarcinomas fueron de grado III y la mayoría de los carcinomas simples, carcinomas complejos y carcinomas de tipo mixto fueron de grado I. En la Tabla 3 del Anexo I se puede consultar esta información de forma más detallada.

Debido al alto número de subtipos histológicos y el bajo número de perras en algunas de esas categorías, se estudió la asociación estadística existente entre el grado histológico y la variable HD3, que agrupa distintos subtipos histológicos, observándose una asociación estadísticamente significativa entre estas dos variables ($p < 0,01$). También se asoció de forma significativa con el grado histológico la presencia o ausencia de proliferación mioepitelial ($p = 0,005$), ya que la mayoría de los tumores de grado III no mostraron PM (16/17; 94,1%).

En el curso de la mastectomía ($n=65$), se realizó linfadenectomía en 40pacientes. En el correspondiente examen histopatológico de las muestras ganglionares se detectó metástasis ganglionar regional en 5 perras que presentaban neoplasias de grado III (2 comedocarcinomas, 1 carcinoma sólido, 1 carcinoma anaplásico y 1 carcinoma adenoescamoso) ($p < 0,001$). En 4 de estos 5 animales, se había realizado un diagnóstico previo a la cirugía de la metástasis ganglionar por citología ($p < 0,001$).

3.4. Estudio pronóstico

3.4.1. *Análisis univariante de puntos finales de seguimiento clínico y supervivencia*

a) *Recidivas/metástasis.*

Se observó una asociación significativa entre el grado histológico y el desarrollo de recidivas o metástasis ($p < 0,001$) como se describe a continuación: la mayoría de los tumores que recidivaron y/o metastatizaron eran de grado III (10/14; 71,42%) (Tabla 3 del Anexo I). La edad (animales entre 9 y 11 años; $p = 0,01$) y el estado reproductivo ($p = 0,01$) fueron las variables epidemiológicas que se asociaron al desarrollo de recidivas y/o metástasis (14/65). El tipo histológico ($p < 0,001$), la ausencia de PM ($p = 0,02$) y la variable HD3 ($p < 0,001$) también se asociaron a la aparición de recidivas y/o metástasis. El carcinoma sólido fue el tipo histológico que recidivó o metastatizó de forma más frecuente (6/14; 40%), seguido por el comedocarcinoma (3/14; 20%), el carcinoma simple (2/14; 13,3%), el carcinoma adenoescamoso (2/14; 13,3%) y el carcinoma complejo (1/14; 6,7%).

Otras variables que se asociaron al desarrollo de recidivas y/o metástasis fueron la existencia de metástasis ganglionar con confirmación histológica ($p = 0,002$), el estadio clínico ($p < 0,001$) y la muerte como consecuencia del cáncer ($p < 0,001$).

b) Muerte asociada a cáncer mamario

La muerte como consecuencia del cáncer mamario (13/65) estuvo asociada al grado histológico ($p < 0,001$) (Tabla 4 del Anexo I). Otras variables que también estuvieron asociadas a la muerte debida al cáncer fueron: la edad (categoría 9-11 años; $p = 0,01$), el tamaño de las perras (9/13; 69,23% de los perros que murieron debido al tumor mamario fueron de raza de gran tamaño, $p = 0,02$), el estadio clínico (6/7 animales en estadio IV murieron durante el periodo de seguimiento; $p < 0,001$), el tamaño tumoral según la OMS ($p = 0,03$), el diagnóstico histológico ($p = 0,01$), la variable HD3 ($p < 0,001$), la ausencia de PM ($p = 0,004$) y la metástasis ganglionar en el momento de la cirugía ($p < 0,001$).

c) Estudio de supervivencia univariante: curvas de supervivencia de Kaplan-Meier

❖ Tiempo libre de enfermedad (TLE)

El análisis de supervivencia a través de las pruebas log-rank de Kaplan-Meier encontró una asociación significativa entre el TLE (meses) y el grado histológico ($p < 0,001$) como se describe a continuación: el grado I tuvo un valor medio, mínimo y máximo de TLE de 37,29 meses, 35,93 meses y 38,68 meses respectivamente; el grado II tuvo un valor medio, mínimo y máximo de TLE de 32,68 meses, 27,15 meses y 38,21 meses respectivamente; y el grado III tuvo un valor medio, mínimo y máximo de TLE de 7,78 meses, 11,39 meses y 24,17 meses respectivamente. Otras variables que se asociaron con el TLE fueron la edad (variable categórica; menor TLE a los 9-11 años; $p = 0,009$), la castración ($p = 0,020$) (Fig. 7a del Anexo I), el estadio clínico (estadio I vs. estadio IV; $p <$

0,001), la variable HD3 (grupo 1 vs. grupo 2; $p < 0,001$), la ausencia de PM ($p = 0,03$) y la afectación ganglionar ($p < 0,001$).

❖ Supervivencia total (ST)

La ST se asoció con el grado histológico ($p < 0,001$) como se detalla a continuación (Fig. 7b del Anexo I): todos los animales que presentaron neoplasias de grado I estaban vivos al finalizar el periodo de seguimiento (superior a 38 meses); los animales que presentaron tumores mamarios de grado II tuvieron un valor medio, mínimo y máximo de ST de 32,84 meses, 27,48 meses y 38,20 meses respectivamente, y los animales que presentaron neoplasias de grado III tuvieron un valor medio, mínimo y máximo de ST de 20,36 meses, 13,95 meses y 26,77 meses, respectivamente. La edad (menos ST en la categoría 9-11 años ($p = 0,006$) (Fig. 7c del Anexo I), la raza (las razas pequeñas tuvieron mejores valores de ST; $p = 0,018$) (Fig. 7d del Anexo I), el estadio clínico (I vs. II vs. IV; $p < 0,001$) (Fig. 7e del Anexo I), el tamaño tumoral (<1 cm, 1 - 2,9 cm, ≥ 3 cm; $p = 0,008$) (Fig. 7f del Anexo I), el tamaño según la OMS ($p = 0,015$), la variable HD3 (grupo 1 vs. 2; $p < 0,001$) y la metástasis ganglionar ($p < 0,001$) también se asociaron de forma significativa a la ST.

d) Estudio de supervivencia multivariante

Para esclarecer el valor pronóstico independiente del sistema de gradación en un modelo combinado de posibles variables predictivas, se realizaron regresiones de tipo Cox del TLE y de la ST (Tabla 2 del Anexo I).

❖ Variable dependiente TLE

Teniendo en cuenta la variable TLE como variable dependiente, se seleccionaron el grado histológico, el estadio clínico y el estado reproductivo (castrada) como variables independientes (covariantes) en el paso final (paso 3), indicando así que estas variables aportaron información de forma independiente acerca del desenlace de los animales. En este modelo, haciendo “fijas” las

variables grado histológico y estadio clínico, el estado reproductivo de los animales proporcionó la siguiente información adicional ($p = 0,01$): el riesgo relativo de desarrollar recidivas y/o metástasis en las hembras castradas fue 4,5 veces mayor ($\text{Exp}(\beta)$, Tabla 2 del Anexo I) que en las hembras enteras.

❖ Variable dependiente ST

Teniendo en cuenta la ST como la variable dependiente, se seleccionaron el grado histológico y el estadio clínico como covariantes en el paso final (paso 2). En los modelos de regresión tipo Cox puede aplicarse la siguiente fórmula en cada paso para obtener los riesgos proporcionales con las covariantes independientes seleccionadas (Tabla 2 del Anexo I): $RR = \exp(\beta_1 X_1 + \dots + \beta_n X_n)$

La discusión de estos resultados aparece agrupada en la sección de Discusión General.

CAPÍTULO II

El cáncer mamario canino como modelo para el estudio
del cáncer mamario humano: similitudes y diferencias
hormonales

VI. CAPÍTULO II

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El cáncer de mama es el tipo de cáncer diagnosticado con mayor frecuencia y la principal causa de muerte por cáncer en la mujer a nivel mundial (Boyle y Ferlay, 2005, Du y col., 2008). En las hembras de la especie canina también son las neoplasias más frecuentes, suponiendo el 52% de todos los tumores (Dorn y col., 1968, Schneider y col., 1969, Clemente y col., 2010b).

El CMC es un cáncer que surge de forma espontánea y que ha sido propuesto en numerosas ocasiones para el estudio del CMH (MacEwen, 1990, Knapp y Waters, 1997, Vail y MacEwen, 2000, Peña y col., 2003a, Antuofermo y col., 2007, Liu y col., 2014); sin embargo, la mayoría de los aspectos comparables, incluyendo el perfil hormonal, todavía no se han evaluado.

1.1. Características histopatológicas del cáncer mamario humano y canino

Antes de comentar aspectos más específicos sobre las hormonas esteroides en ambas especies, conviene revisar los aspectos histopatológicos desde un punto de vista comparativo.

La clasificación histológica de los tumores mamarios humanos que se emplea actualmente fue creada por Tavassoli y Devilee en 2003.

En un estudio realizado en 1995 con 158.621 cánceres invasivos y 10.639 cánceres in situ se ha visto que los carcinomas ductales invasivos tipo NOS (not otherwise specified) eran los cánceres más comunes, suponiendo Alrededor del 70% de los cánceres mamarios, con tasas de supervivencia a los 5 años del 79%. Los carcinomas lobulares infiltrantes constituyeron alrededor del 6%, con tasas de supervivencia semejantes a la anterior y los carcinomas de bajo grado (tubular, mucinoso y papilar) supusieron un porcentaje bajo de los casos, alrededor del 4%. Las mujeres diagnosticadas de carcinomas in situ tuvieron tasas de supervivencia del 100% (Berg y Hutter, 1995).

A continuación se muestra la clasificación histológica de los tumores mamarios humanos:

CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TUMORES MAMARIOS HUMANOS	
TUMORES EPITELIALES	LESIONES MIOEPITELIALES
Carcinoma ductal invasivo (NOS) C. Tipo mixto C. Pleomórfico C. con células osteoclasticas gigantes C. con rasgos coriocarcinomatosos C. con rasgos melanóticos Carcinoma lobular invasivo Carcinoma tubular Carcinoma cribiforme invasivo Carcinoma medular Carcinoma mucinoso C. Mucinoso Cistoadenocarcinoma C. mucinoso de céls columnares C. de céls en anillo de sello Tumores neuroendocrinos Carcinoma papilar invasivo Carcinoma micropapilar invasivo Carcinoma apocrino Carcinomas metaplásicos C. de células escamosas Adenocarc. con metaplasia de céls fusiformes C. adenoescamoso C. mucoepidermoide C. metaplásico mesenquimatoso Carcinoma rico en lípidos Carcinoma secretor Carcinoma oncocítico Carcinoma cístico adenoide Carcinoma de células acínicas Carcinoma rico en células de glucógeno Neoplasia lobular Carcinoma lobular <i>in situ</i> Lesiones intraductales proliferativas Hiperplasia ductal usual Atipia epitelial plana Hiperplasia ductal atípica Carcinoma ductal <i>in situ</i> Carcinoma microinvasivo Neoplasias papilares intraductales Papiloma central Papiloma periférico Papiloma atípico Carcinoma papilar intraductal Carcinoma papilar intraquistico Proliferaciones epiteliales benignas Adenosis Lesión compleja esclerosante Adenomas Adenoma tubular Adenoma lactacional Adenoma apocrino Adenoma pleomórfico Adenoma ductal	Mioepiteliosis Adenosis mioepitelial Adenomioepitelioma Mioepitelioma maligno
	TUMORES MESENQUIMATOSOS
	Hemangioma Angiomatosis Hemangiopericitoma Hiperplasia estromal pseudoangiomatosa Miofibroblastoma Fibromatosis Tumor inflamatorio miofibroblástico Lipoma Angiolipoma Tumor de células granulares Neurofibroma Schwannoma Angiosarcoma Liposarcoma Rabdomiosarcoma Osteosarcoma Leiomioma Leiomiomasarcoma
	TUMORES FIBROEPITELIALES
	Fibroadenoma Tumor Filoides Benigno Borderline Maligno Sarcoma periductal estromal de bajo grado Hamartoma mamario
	TUMORES DEL PEZÓN
	Adenoma del pezón Adenoma siringomatoso Enfermedad de Paget del pezón
	LINFOMA MALIGNO
	TUMORES METASTÁSICOS
	TUMORES EN EL HOMBRE
	Ginecomastia Carcinoma Invasivo <i>In situ</i>

El objetivo de cualquier clasificación histológica y gradación es aportar un método para la emisión de un pronóstico en lo relativo al comportamiento de las neoplasias en el paciente. Así, los carcinomas mamarios han sido divididos en tipos de pronóstico favorable o desfavorable. El tipo tumoral, aunque es importante, no influye en el estadio tumoral. Ciertos tipos de carcinomas mamarios (tubular, mucinoso y quístico adenoide) son generalmente de bajo grado y están asociados con nula o muy baja tasa de invasión ganglionar y un pronóstico relativamente bueno. Los poco diferenciados, como los carcinomas en anillo de sello o los carcinosarcomas, son considerados generalmente muy agresivos. En otro estudio, los carcinomas mucinosos, papilares y tubulares estuvieron asociados con el mejor pronóstico (Donegan, 1977). Como ya se ha dicho anteriormente, el cáncer mamario con peor pronóstico es el CI (*Anderson y col., 2005*).

Las neoplasias mamarias en la perra se originan de las células epiteliales ductales o alveolares, de las células mioepiteliales o de los tejidos conectivos intersticiales (*Misdorp, 2002*).

La heterogeneidad histológica observada en las neoplasias mamarias caninas presenta una considerable dificultad a la hora de designar un método preciso para la emisión de un diagnóstico. Hasta hace poco tiempo, la clasificación más empleada en el diagnóstico de las neoplasias mamarias era la aceptada por la Organización Mundial de la Salud, que fue creada por Misdorp y sus colaboradores en 1999, se basa en la morfología descriptiva del tumor y los tumores son clasificados como complejos cuando están presentes tanto las células epiteliales secretoras como las mioepiteliales y simples cuando sólo uno de esos tipos está presente (*Misdorp y Organización Mundial de la Salud (Washington). Collaborating Center for Comparative Oncology, 1999*).

Sin embargo, debido a la falta de acuerdo en el diagnóstico de las neoplasias mamarias caninas, se ha publicado recientemente otra clasificación para las neoplasias mamarias caninas, tras el consenso de reconocido patólogos veterinarios (*Goldschmidt y col., 2011*). Esta nueva clasificación incluye nuevos subtipos histológicos de neoplasias mamarias caninas que no se describían en la clasificación previa (*Misdorp y col., 1999*), y se resume a continuación:

CAPÍTULO II

Grupo 1: NEOPLASIAS EPITELIALES MALIGNAS

Carcinoma <i>in situ</i>	
Carcinoma simple	C. Tubular C. Tubulopapilar C. Císticopapilar C. Cribiforme
Carcinoma micropapilar invasivo	
Carcinoma sólido	
Comedocarcinoma	
Carcinoma anaplásico	
Carcinoma que se origina en un adenoma complejo / tumor mixto	
Carcinoma de tipo complejo	
Carcinoma y mioepitelioma maligno	
Carcinoma de tipo mixto	
Carcinoma ductal	
Carcinoma papilar intraductal	

Grupo 2: NEOPLASIAS EPITELIALES MALIGNAS, TIPOS ESPECIALES

Carcinoma de células escamosas	
Carcinoma adenoescamoso	
Carcinoma mucinoso	
Carcinoma rico en lípidos	
Carcinoma de células alargadas	Mioepitelioma maligno Carcinoma de células escamosas de variante células alargadas Carcinoma de variante de células alargadas
Carcinoma inflamatorio	

Grupo 3: NEOPLASIAS MESENQUIMATOSAS MALIGNAS / SARCOMAS

Osteosarcoma	
Condrosarcoma	
Fibrosarcoma	
Hemangiosarcoma	
Otros sarcomas	

Grupo 4: TUMORES MAMARIOS MALIGNOS MIXTOS

Carcinosarcoma	
----------------	--

Grupo 5: NEOPLASIAS BENIGNAS

Adenoma simple	
Adenoma papilar intraductal (papiloma ductal)	
Adenoma ductal (adenoma basaloide)	Con diferenciación escamosa
Fibroadenoma	
Mioepitelioma	
Adenoma complejo (adenomioepitelioma)	
Tumor mixto benigno	

Grupo 6: DISPLASIA / HIPERPLASIA

Ectasia ductal	
Hiperplasia lobular (adenosis)	Regular Con actividad secretora Con fibrosis interlobular Con atipia
Epiteliosis	
Papilomatosis	
Cambios fibroadenomatosos	
Ginecomastia	

Grupo 7: NEOPLASIAS DEL PEZÓN

Adenoma
Carcinoma
Carcinoma con infiltración epidérmica (Enfermedad de Paget)

Grupo 8: HIPERPLASIA / DISPLASIA DEL PEZÓN

Melanosis de la piel del pezón

Es difícil determinar exactamente el porcentaje de malignidad basándose en diagnósticos histológicos, ya que la mayoría de las lesiones pequeñas nunca son biopsiadas, aunque habitualmente la malignidad se sitúa entre el 40% y el 52% de los TMC (*Misdorp y col., 1999*).

A pesar de la diversidad de criterios, todos los autores coinciden en señalar que los TMC de peor pronóstico son los sarcomas (*Misdorp y Organización Mundial de la Salud (Washington). Collaborating Center for Comparative Oncology, 1999, Goldschmidt y col., 2011*). Otros diagnósticos histológicos se pueden clasificar de peor a mejor pronóstico en: carcinosarcomas, carcinomas

anaplásicos, sólidos y de células escamosas, carcinomas tubulares y papilares y finalmente carcinomas *in situ*. En general, los carcinomas complejos, por poseer proliferación de células mioepiteliales, suelen tener un mejor pronóstico que los simples, ya que carecen de ellas (Goldschmidt y col., 2011).

Otras diferencias específicas entre las neoplasias mamarias humanas y las neoplasias caninas que presentan relevancia y requieren ser evaluadas son la alta proporción de tumores con proliferación mioepitelial en las neoplasias caninas y la alta frecuencia de neoplasias caninas benignas y malignas de tipo mixto (Goldschmidt y col., 2011).

1.2. Producción de hormonas esteroides en la mujer y en la perra

La producción de hormonas sexuales esteroides a lo largo de la vida de una hembra mamífera es amplia y variada, con importantes cambios en las diferentes etapas de la misma. Los ovarios fabrican tres clases principales de hormonas sexuales: los estrógenos, los progestágenos y los andrógenos (Feldman y Nelson, 2004, Goodman, 2009, Rijnberk y Kooistra, 2010). La producción de hormonas esteroides por el ovario está sujeta a un complejo mecanismo de regulación, en el que las hormonas hipofisarias foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) juegan un papel determinante (Amado y Flórez, 2003, Díaz Chico, 2004, Rijnberk y Kooistra, 2010).

Los estrógenos son capaces de inducir fenómenos de proliferación celular sobre órganos como el endometrio, la mama y el propio ovario (Gruber y col., 2002). Su producción cíclica es la responsable del ciclo estral (Feldman y Nelson, 2004, Goodman, 2009, Rijnberk y Kooistra, 2010). Los estrógenos son los responsables del desarrollo de los conductos, de la proliferación del estroma y del depósito de grasa en la GM, así como responsable, junto con la progesterona y la prolactina, del desarrollo de la porción lobuloalveolar de la mama (Goodman, 2009).

La progesterona es el principal progestágeno natural producido por el ovario; es capaz de estimular el desarrollo del endometrio, preparando al útero

para la recepción del blastocisto y su posterior desarrollo durante el embarazo (Goodman, 2009). La progesterona también favorece el desarrollo de los acinis glandulares de la mama disponiéndola para la lactancia (Feldman y Nelson, 2004, Rijnberk y Kooistra, 2010).

Los andrógenos son los esteroides sexuales más abundantes en el torrente circulatorio. Son precursores necesarios para la síntesis de estrógenos en el ovario, y se encuentran asociados a los caracteres sexuales secundarios del macho (Mooradian y col., 1987, Feldman y Nelson, 2004, Goodman, 2009, Rijnberk y Kooistra, 2010).

Se deberían considerar varias diferencias entre la especie humana y canina en los ciclos hormonales que pueden influir en la patogénesis del cáncer de mama, como la ausencia de menopausia en la perra y las diferentes características que presenta la perra en su ciclo estral, ya que las perras tienen únicamente uno o dos estros por año, lo que representa una baja influencia estrogénica (Feldman y Nelson, 2004).

1.2.1. Producción de estrógenos en la mujer

En las mujeres premenopáusicas la mayor parte de los estrógenos circulantes son producidos por los ovarios (folículos y cuerpo lúteo), por la placenta (durante el embarazo) y en menores cantidades por las glándulas adrenales (Gruber y col., 2002). De los más de veinte tipos de estrógenos identificados, los que parecen tener una mayor importancia clínica son el 17 β -estradiol y dos de sus metabolitos; la estrona y el estriol (Burtis y col., 1999).

En la mujer, el 17 β -estradiol es el estrógeno más potente secretado por el ovario, que sintetiza más del 95% del mismo (Goodman, 2009). La estrona y el estriol también se producen en el hígado o en tejidos extragonadales a partir de precursores androgénicos (Nelson y Bulun, 2001). En las mujeres la producción ovárica de estrógenos se ve notablemente mermada tras la menopausia y los niveles de estradiol disminuyen notablemente. En este periodo la mayor parte de los estrógenos se sintetizan extragonadalmente en el hígado y otros tejidos

periféricos, a partir de precursores androgénicos producidos por las glándulas suprarrenales y en menor proporción por el ovario (*Nelson y Bulun, 2001*).

1.2.2. Producción de andrógenos en la mujer

Las principales hormonas esteroideas circulantes clasificadas como andrógenos son la dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS), dehidroepiandrosterona (DHEA), androstendiona, testosterona y dihidrotestosterona (en orden decreciente según su concentración sérica) (*Burger, 2002*).

La testosterona es el andrógeno natural más potente. El 50% de esta hormona deriva de los ovarios y las glándulas adrenales a partes iguales, mientras que el 50% restante, procede de la conversión periférica de la androstendiona. Esta última también es producida por las glándulas adrenales y los ovarios en una proporción similar (*Burger, 2002*).

La DHEA actúa como un precursor para la síntesis periférica de otros andrógenos más potentes. Es producida por las glándulas adrenales (50%) y los ovarios (20%), aunque puede ser sintetizada a partir de la DHEAS circulante (30%), gracias a la acción de sulfatasas esteroideas (*Longcope, 1986*).

La dihidrotestosterona es un producto de la conversión periférica de la testosterona y circula a baja concentración en el suero (*Abraham, 1974*). Sólo la testosterona y la dihidrotestosterona son capaces de unirse al receptor de andrógenos. Las otras tres hormonas son consideradas pro-andrógenos (*Burger, 2002*).

Los andrógenos producidos por las células tecales ováricas sirven como sustrato para la síntesis de estrógenos (*Goodman, 2009*). La enzima aromatasa, muy importante en el metabolismo de las hormonas sexuales esteroideas, es la principal responsable de la transformación de los andrógenos en estrógenos (*Abraham, 1974*).

1.2.3. Producción de estrógenos y progestágenos en la perra

En la perra el comienzo de la pubertad se da entre los 6 y los 18 meses de edad. Después de cada ciclo estral, el cual tiene una duración de unos 3 meses, sobreviene un anestro con una duración variable. Las fases que se describen en el ciclo estral en la perra de acuerdo a la función ovárica son la fase folicular, la fase de luteinización preovulatoria y la ovulación, y la fase lútea. Durante la fase folicular se produce un pico de estradiol, hormona responsable de los signos externos del proestro observados en las hembras (hiperemia, edema vulvar y descarga vaginal). Al final de la fase folicular se produce el descenso del estradiol y el incremento en las concentraciones de progesterona, que da paso a la fase de luteinización preovulatoria y posterior ovulación. Finalmente, la fase lútea se caracteriza por los altos niveles de progesterona en sangre periférica, y en caso de que no se produzca la preñez, éstos disminuyen lentamente y se produce la transición gradual al anestro, durante el cual las concentraciones de estradiol y progesterona son bajas (*Rijnberk y Kooistra, 2010*).

1.2.4. Producción de andrógenos en la perra

Al igual que ocurre con los estrógenos, se han observado variaciones de concentración de la testosterona sérica en la perra a lo largo del ciclo estral (*Olson y col., 1984*). Dado que el anestro es una fase de reposo en la actividad ovárica, es en esta fase cuando los niveles de testosterona son menores. Posteriormente, durante la fase folicular se observa un incremento que alcanza su máximo en la fase de luteinización preovulatoria. A pesar de que se ha descrito que la administración de testosterona exógena en hembras esterilizadas puede inducir receptividad sexual, no se conocen bien los efectos de los andrógenos en el ciclo estral. No obstante, se reconoce que hay gran variabilidad individual (*Rota y col., 2007*).

No se ha podido esclarecer todavía si esta diferencia hormonal en los ciclos hormonales de ambas especies se refleja en el nivel de hormonas y la presencia de receptores hormonales a nivel local en los tejidos mamarios tumorales.

1.3. Receptores hormonales en tumores mamarios de la especie humana y canina

La presencia de receptores de estrógenos y progesterona en los TMC ha sido una de las similitudes encontradas entre ambas especies que apoya el empleo del modelo canino para el estudio del CMH (*MacEwen, 1990, Knapp y Waters, 1997, Vail y MacEwen, 2000, Peña y col., 2003b, Yang y col., 2006, Antuofermo y col., 2007, Gama y col., 2008a, Kim y col., 2014, Mainenti y col., 2014*). Recientemente el papel de los receptores de estrógenos (RE α , normalmente conocido como RE) y de progesterona (RP) en el desarrollo y pronóstico del cáncer mamario de la mujer ha sido revisado con profundidad, observándose un mejor pronóstico en los cánceres positivos a estos receptores (*Wu y col., 2015*).

Los estrógenos son hormonas esteroides que tienen un efecto proliferativo en el epitelio mamario normal a través de la activación del receptor de estrógenos (RE), un receptor clásicamente nuclear (*Goodman, 2009*). El RE está sobre-expresado aproximadamente un 70% de los cánceres mamarios, y por ello, es una molécula diana para el tratamiento del cáncer de mama, así como para su prevención (*Tavassoli, 1999b*).

Los estrógenos pueden cumplir sus funciones a través de mecanismos genómicos o no genómicos. Las acciones genómicas se refieren a la regulación de la transcripción por la unión del ligando al RE. Por el contrario, los mecanismos no genómicos son extremadamente rápidos y se cree que ocurren con RE ubicados en el citosol. Estas acciones del RE no-nuclear producen una activación rápida de quinasas reguladoras del crecimiento incluyendo los receptores de factores de crecimiento epidérmico. Esta comunicación es bidireccional, de modo que se cree que la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER-2) puede estar implicada en los mecanismos de resistencia a los tratamientos antiestrogénicos (*DeVita y col., 2008*).

Las células epiteliales de la GM humana son inmunoreactivas para el RE y el RP, mientras que el componente mioepitelial no lo es. Las células del estroma intramamario, las cuales representan el componente del estroma mamario

hormono-sensitivo, tampoco expresan estos receptores hormonales. Varios estudios inmunohistoquímicos sugieren que la mayoría de las hiperplasias intraductales y los carcinomas ductales in situ (CDIS) de bajo grado de malignidad expresan altos porcentajes de receptores hormonales (aproximadamente del 80% al 100% de las lesiones expresan el RE y en cuanto al RP, son positivas del 80% al 100% de las hiperplasias y del 65% al 80% de los carcinomas in situ de bajo grado). Por el contrario, estos porcentajes descienden en los CDIS de alto grado de malignidad histológica, pues expresan el RE en el 20-75% de los casos, y el RP en el 12-75% (*Tavassoli, 1999b*).

Existe controversia en cuanto a la expresión de estos receptores hormonales en los fibroadenomas (tumores bifásicos); no parece existir acuerdo en cuanto a qué tipo celular expresa los receptores, ya que existen varios estudios que aseguran que el epitelio es mayoritariamente negativo al RE y positivo al RP, aunque la hipótesis más aceptada es que tanto el componente epitelial como el estroma muestran positividad a ambos receptores, pero no el componente mioepitelial, como era de esperar (*Opric y col., 2012*).

Los carcinomas ductales infiltrantes son positivos al RE en el 55% al 72% de los casos y la positividad al RP se da en aproximadamente del 33% al 70% de los casos, pero la positividad decrece con el aumento del grado de malignidad (carcinomas poco diferenciados). Alrededor del 15% de los tumores son positivos al RE α , pero negativos al RP (*DeVita y col., 2008*). La supervivencia a los cinco años después del diagnóstico es del 91% en mujeres con tumores RE+ y del 77% en mujeres con tumores RE- (*Jaiyesimi y col., 1992*).

Se estima que entre el 80% y el 85% de las células epiteliales del tejido mamario normal expresan receptor de estrógenos beta (RE β) (*Anderson y col., 2005*). Existen escasos estudios sobre el Re β en cáncer mamario humano. El CDIS parece tener una expresión de este receptor reducida en comparación con el epitelio normal, siendo esta reducción más acusada en los casos de CDIS de alto GHM (*Markopoulos y col., 1988, Ricketts y col., 1991*). Los cánceres de tipo invasivo también tienden a disminuir los porcentajes de positividad a este receptor, aunque todavía dos tercios de los tumores suelen ser RE β + (*Roger y col., 2001*).

El receptor de andrógenos (RA), también poco estudiado en el CMH, pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares de hormonas esteroideas. Funciona como un factor de transcripción dependiente de ligando que regula la transcripción de genes implicados en diversos procesos fisiológicos entre los que se encuentran la proliferación y la diferenciación celular en tejidos diana (*Mooradian y col., 1987*).

Generalmente el RA se encuentra de forma inactiva en el citoplasma celular formando un complejo con varias proteínas *heat shock*, entre las que se encuentran Hsp90, Hsp70 y Hsp56. La unión de la hormona (testosterona o dihidrotestosterona) al dominio de unión al ligando produce un cambio conformacional de la molécula que promueve la liberación de las proteínas *heat shock* y permite su translocación al núcleo. Una vez allí, el RA se dimeriza formando homodímeros que se unen a los elementos de respuesta a andrógenos, localizados en las regiones reguladoras de genes diana regulados por andrógenos. Esta unión desencadena el reclutamiento de otras proteínas esenciales para la expresión de estos genes, como cofactores o elementos pertenecientes a la propia maquinaria de transcripción (*Pratt y Toft, 1997*).

A pesar de que aún son escasos los estudios sobre este receptor, en los últimos años ha crecido su investigación de forma notable. Los receptores de andrógenos están presentes tanto en el tejido mamario normal, como en líneas celulares de cáncer de mama (*Hickey y col., 2012*). Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se ha observado que el RA se expresa frecuentemente en los tumores mamarios malignos invasivos y no invasivos, siendo los carcinomas altamente malignos RE- , RP- y RA+ (*Moinfar y col., 2003*). Según parece, el RA llega a expresarse hasta en un 70% - 90% de los cánceres de mama invasivos (*Selim y col., 2002, Conde y col., 2004*), una frecuencia comparable o incluso mayor a la establecida para el RE y el RP. Aunque se ha demostrado que existe una relación entre el RA y los RE y RP (*Lippman y col., 1976, Kuenen-Boumeester y col., 1996, Lillie y col., 2003, Riva y col., 2005, Nicolas Diaz-Chico y col., 2007*), el hecho de que un considerable número de tumores son negativos a RE y RP pero positivos a RA, manifiesta la independencia de este receptor (*Riva y col., 2005*). El RA también se ha detectado en porcentajes mayores en el CDIS

adyacente a los carcinomas invasivos que en los CDIS puros (*Isola, 1993*), sugiriendo así que el RA se relaciona con la infiltración, al menos en las etapas tempranas de progresión tumoral.

Los receptores de hormonas esteroideas también se han estudiado en los tumores mamarios caninos. A pesar de que la detección de RE y del RP no se realiza de forma rutinaria en términos de diagnóstico y pronóstico como sucede en medicina humana, varias investigaciones han demostrado su presencia y, en el caso de RE su relación con el pronóstico (RE α) (*Nieto y col., 2000, Illera y col., 2006, Sorenmo y col., 2011*). A pesar de que no hay muchos datos respecto a la detección inmunohistoquímica de los receptores hormonales en las neoplasias mamarias caninas, los datos existentes son bastante controvertidos. La variación en la metodología y en la interpretación de la inmunotinción parece ser uno de los mayores problemas (*Peña y col., 2014*). Recientemente se han publicado unas directrices de consenso para los receptores hormonales y otros marcadores inmunohistoquímicos en los TMC (*Peña y col., 2014*).

El epitelio de la glándula mamaria normal de la perra es positivo al RE (*Illera y col., 2006*). La tinción se localiza en el núcleo de las células epiteliales y mioepiteliales, pero no en las del estroma, siendo la intensidad homogénea en las células de un mismo lóbulo, pero no así de un lóbulo a otro de la misma muestra (*Illera y col., 2006*). En cuanto a la positividad de los tejidos neoplásicos existe cierta controversia, ya que mientras que unos estudios aseguran una alta positividad de los TMC malignos (*Millanta y col., 2005, Kumaraguruparan y col., 2006, Yang y col., 2006, Gama y col., 2008a*), otros aseguran altos porcentajes de negatividad a este receptor en los TMC malignos, entre un 77% (*Nieto y col., 2000*) y un 94% (*de Las Mulas y col., 2005, Illera y col., 2006, Port Louis y col., 2012*); este hecho podría atribuirse a las diferencias encontradas en la metodología de detección del receptor. En los TMC benignos, mientras existen estudios que aseguran su negatividad (*Port Louis y col., 2012*), otros establecen que un 53,5% de los TMC benignos son positivos al RE (*de Las Mulas y col., 2005*).

En cuanto a la expresión inmunohistoquímica del RP en los TMC parece existir un mayor acuerdo. Mientras que la GM normal presenta siempre positividad

al receptor, en los TMC malignos la positividad se encuentra entre 40 % y el 65 %, siendolos carcinomas *in situ* más positivos que los invasivos (*de Las Mulas y col., 2005, Millanta y col., 2005, Millanta y col., 2009, Port Louis y col., 2012*). Los TMC benignos son positivos en porcentajes entre un 50% (*Millanta y col., 2005, Port Louis y col., 2012*) y un 91% (*de Las Mulas y col., 2005*). No obstante, los tumores mamarios caninos positivos al RE, generalmente, tienen mejor pronóstico y supervivencia (*Nieto y col., 2000, de Las Mulas y col., 2005*).

Como sucede en el CMH, el REβ está mucho menos estudiado en los TMC. Se ha detectado su expresión inmunohistoquímica en el epitelio de los acinis y los ductos en la mama normal (*Illera y col., 2006*). Mientras que existe consenso en cuanto a la alta positividad de los TMC benignos al REβ, entre el 60% y el 80% en la mayoría de los estudios (*Port Louis y col., 2012, Martín de las Mulas y col., 2004*), la positividad de los TMC malignos es controvertida. De las Mulas y col. (2004) establecieron una positividad baja para los TMC malignos (27%) y además vieron que este receptor era más frecuente en los TMC malignos complejos y mixtos. Dado que estos dos subtipos histológicos suelen ser de menor GHM, sugiere que este receptor podría ser un factor de pronóstico favorable, aunque no se ha estudiado como tal (*Martín de las Mulas y col., 2004*). Otros autores, sin embargo, encuentran mayores porcentajes de TMC malignos ERβ positivos (entre el 78% y el 81%) con diferentes intensidades de inmunoexpresión (*Illera y col., 2006, Port Louis y col., 2012*).

La mama normal presenta baja a moderada intensidad inmunoreactividad al RA, distribuyéndose por el núcleo y el citoplasma de las células epiteliales y mioepiteliales de los acinis y los conductos, de forma uniforme en los lóbulos. La mayoría de los TMC malignos expresan el RA con unas intensidades mayores que la GM normal (*Illera y col., 2006*).

1.4. Efecto de las hormonas esteroideas a nivel local en la glándula mamaria

Como ya se hemos comentado anteriormente, existen claras evidencias de que las hormonas sexuales esteroideas están implicadas en el desarrollo de esta

enfermedad. Numerosos estudios han demostrado que los estrógenos actúan como estimulantes de la proliferación epitelial y el crecimiento de la glándula mamaria (*Clemons y Goss, 2001*). Por el contrario el papel de los andrógenos en el cáncer de mama es confuso, ya que no se sabe con seguridad si actúan como estimulantes o represores del crecimiento y la proliferación celular. Aunque la mayoría de los estudios respaldan la hipótesis de que los andrógenos podrían actuar contrarrestando el efecto mitogénico y promotor de los estrógenos sobre el tejido mamario, los resultados de los diferentes estudios (epidemiológicos y experimentales) son, en muchos casos, contradictorios (*Lippman y col., 1976, Secreto y col., 1989, Vihko y Apter, 1989, Recchione y col., 1995, Secreto y col., 1996, Liao y Dickson, 2002, Nicolas Diaz-Chico y col., 2007, Sasano y col., 2008, Stanczyk y col., 2015*).

Los experimentos realizados en diversas líneas celulares de cáncer de mama, muestran mayoritariamente un papel antiproliferativo y apoptótico de los andrógenos (*Labrie y col., 2003*). Sin embargo, los resultados de algunos estudios señalan que en determinadas circunstancias los andrógenos también pueden ejercer efectos proliferativos sobre las células cancerosas cancerosas (*Boccuzzi y col., 1994, Birrell y col., 1995*). Esta divergencia de resultados parece obedecer a diferencias en las líneas celulares empleadas en los experimentos, al tipo de andrógeno suministrado, a la dosis y al estado estrogénico (*Dimitrakakis y col., 2002*).

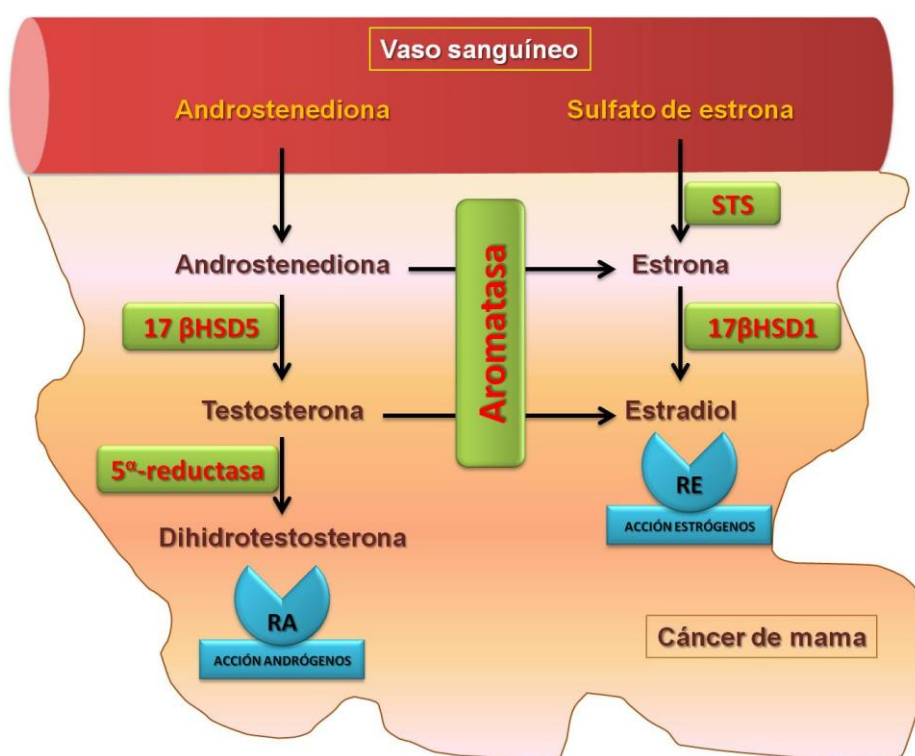
Los estudios *in vivo* realizados en ratas, también muestran un efecto inhibitorio de los andrógenos (testosterona, dihidrotestosterona y DHEAS) sobre los efectos proliferativos de los estrógenos (*Dauvois y col., 1989, Li y col., 1994, McComick y col., 1996, Gatto y col., 1998*).

En la perra, la dependencia hormonal de los tumores mamarios, ha sido objeto de algunos estudios, encontrándose relación entre los niveles hormonales del tejido mamario sano y tumoral y el desarrollo de los tumores (*Vermeulen y col., 1986, Thijssen y col., 1991, Blankenstein y col., 1999, Liao y Dickson, 2002*).

1.5. Producción local de hormonas esteroides en la glándula mamaria

Algunos estudios han demostrado que en la mama normal y en los carcinomas mamarios humanos (Miller y col., 1985, Vihko y Apter, 1989, Honma y col., 2006) y de otras especies animales como la rata (Mori y col., 1978), cabra (Slotin y col., 1970), vaca (Belvedere y col., 1996), perra (d'Arville y col., 1980, Peña y col., 2003a, Marinelli y col., 2004, Sanchez-Archidona y col., 2007) y humanos existe actividad enzimática para la síntesis de esteroides, por lo que es posible que los estrógenos y los andrógenos sean producidos localmente, actuando en los tejidos sin ser liberados al torrente sanguíneo. .

Los mecanismos de producción local de esteroides sexuales en tejidos de carcinoma mamario humano que se asumen actualmente se representan en la siguiente figura (Suzuki y col., 2007):



Los esteroides inactivos circulantes, como androstenediona y sulfato de estrona, son los precursores mayoritarios de la producción local de estrógenos. La citocromo P450-Aromatasa (Arom) es una enzima localizada en el retículo endoplásmico de las células, que cataliza la aromatización de los andrógenos (androstenediona y testosterona) en estrógenos (estrona y estradiol). La sulfatasa

esteroidea (STS) es una enzima que hidroliza el sulfato de estrona a estrona y, posteriormente, la enzima deshidrogenasa 17 β HSD1 cataliza la conversión reversible de estrona a estradiol (estrógeno biológicamente activo), que actúa localmente en las células tumorales mediante su unión al receptor de estrógenos. Por otro lado, la androstenediona circulante es convertida al andrógeno biológicamente activo (dehidrotestosterona, DHT) mediante su unión al RA, a través de enzimas productoras de andrógenos (*Suzuki y col., 2003, Suzuki y col., 2007*).

De las enzimas que participan en la esteroidogénesis, la que más se ha estudiado en el cáncer mamario es la Arom. La expresión de Arom se ha analizado en algunos estudios de CMH (*Suzuki y col., 2003, Sasano y col., 2005, Lykkesfeldt y col., 2009*), asociándose la inmunoreactividad de la enzima con su actividad (*Sasano y col., 2005*) y con la inmunoexpresión del RE (*Lykkesfeldt y col., 2009*). Existe poca información en cuanto a la expresión de esta enzima en el tejido mamario normal o neoplásico canino (*d'Arville y col., 1980, Sanchez-Archidona y col., 2007*).

Los esteroides biológicamente activos que son producidos y secretados por los órganos endocrinos (ovarios, testículos y corteza adrenal) se trasladan a través del sistema circulatorio para actuar en los tejidos diana que presentan sus receptores específicos. Así, las concentraciones plasmáticas de estas hormonas influyen en la fisiología de estos tejidos, como el estradiol, que contribuye especialmente al crecimiento y desarrollo de neoplasias mamarias (*Goodman, 2009*).

En las mujeres con actividad ovárica, el estradiol se origina principalmente en los ovarios; sin embargo, en etapas de reposo ovárico, los estrógenos se tienen que sintetizar a partir de los andrógenos de origen adrenal y ovárico (*Goodman, 2009*). Se ha visto que esta conversión se produce en tejidos periféricos como la piel, músculo, grasa y hueso. Esta conversión está catalizada por la aromatasa (*Suzuki y col., 2003*) (Fig. 1 del Anexo III).

La enzima se encuentra localizada en la membrana del retículo endoplasmático de las células productoras de estrógenos situadas en los ovarios

(células de la granulosa y cuerpo lúteo), testículos (células de Leydig), placenta, tejido adiposo periférico, endometrio, piel, cerebro, etc. La aromatasa también está presente en el tejido mamario, tanto sano como tumoral, donde cataliza la producción local de estrógenos (*Vermeulen y col., 1986, Thijssen y col., 1991, Shenton y col., 1998, Yue y col., 1999, Suzuki y col., 2003, Sasano y col., 2006, Suzuki y col., 2007, Sasano y col., 2008, Haynes y col., 2010*). Este proceso en el que los precursores de las hormonas que se encuentran en la circulación son transformados por las enzimas localizadas en los tejidos periféricos se denomina síntesis intracrina (*Nelson y Bulun, 2001, Labrie, 2003, Labrie y col., 2003, Suzuki y col., 2003, Sasano y col., 2006, Sasano y col., 2008*). Este mecanismo de acción difiere del clásico sistema endocrino en el que sólo una pequeña cantidad de hormona se emplea en los tejidos diana y la gran mayoría se transforma a metabolitos inactivos. En el sistema intracrino sólo se requiere una pequeña concentración de hormona biológicamente activa para producir un máximo efecto, por lo que se piensa que esta producción intracrina de hormonas en el tejido mamario puede ser de gran importancia en la inducción de la malignidad y el crecimiento tumoral (*Suzuki y col., 2003*). Dentro de este sistema intracrino se pueden diferenciar dos acciones, la acción autocrina, en la cual las hormonas producidas localmente actúan sobre la misma célula que las produce, o la acción paracrina, en la que la acción de la hormona producida localmente se limita a las células adyacentes (*Brodie y col., 1997*).

La mayoría de la estrona que se produce por la conversión de andrógenos gracias a la aromatasa, es transformada a sulfato de estrona por la estrona sulfotransferasa, también presente en los tejidos periféricos, incluida la mama (*Hobkirk, 1993*). El sulfato de estrona es un reservorio de la hormona biológicamente activa en los tejidos periféricos. La estrona producida se reduce a estradiol por la hidroxisteroideshidrogenasa, la cual también se localiza en estos tejidos (*Purohit y col., 2003*). Por todo esto, aunque todas estas enzimas tienen una gran importancia en la producción de estradiol en los tejidos periféricos, la aromatasa, como cataliza la reacción inicial de esta cascada, se considera la más importante o limitante (*Vermeulen y col., 1986, Thijssen y col., 1991, Shenton y col., 1998, Yue y col., 1999, Suzuki y col., 2003, Sasano y col., 2006, Suzuki y col., 2007, Sasano y col., 2008, Haynes y col., 2010*).

En la especie humana, la utilización de inhibidores de aromatasa disminuye drásticamente la síntesis de estrógenos en el tejido normal de mama y en el tumoral, por lo que constituye una importante estrategia para reducir los efectos proliferativos de los estrógenos. Los inhibidores de aromatasa han demostrado su eficacia para suprimir la síntesis periférica de estrógenos en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama, por lo que son ampliamente empleados como terapia antiestrogénica (*Smith y Dowsett, 2003, Brueggemeier y col., 2005, Carpenter y Miller, 2005*), obteniéndose beneficio clínico en aproximadamente el 50% de las pacientes (*Bonneterre y col., 2001*). En estas mujeres la positividad en la expresión del RE en el tejido tumoral es un requisito imprescindible que se ha empleado desde 1975 para la utilización de las terapias endocrinas (*Jensen, 1975*).

La enzima aromatasa se ha detectado en fibroblastos, adipocitos, células epiteliales de los conductos mamarios y en las células neoplásicas. En los carcinomas mamarios con células positivas a Arom se ha señalado una asociación positiva entre la proporción de células positivas a aromatasa multiplicado por la intensidad de la inmunoreactividad (*SIP score*) y la actividad enzimática medida por métodos bioquímicos (*Sasano y col., 2005*). Asimismo se ha correlacionado la expresión de aromatasa con la del RE α (*Lykkesfeldt y col., 2009*).

Además, la enzima ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2) ha sido propuesta como un indicador de la expresión de aromatasa. Esta enzima COX-2 es una isoforma de la prostaglandina endoperoxidasa sintetasa que cataliza puntos clave en el metabolismo del ácido araquidónico a la prostaglandina E2 (PGE2). Se ha visto en cultivos celulares como el incremento en la producción de la PGE2 tiene acción intracrina y paracrina para incrementar la expresión de aromatasa (*Richards y col., 2002*).

Aunque existen escasos estudios al respecto, se ha demostrado la presencia de Arom en el tejido mamario canino por RT-PCR. Se ha relacionado una mayor expresión de esta enzima con la malignidad tumoral, ya que los tumores malignos expresaron mayor cantidad de enzima que el tejido mamario normal e hiperplásico (*Marinelli y col., 2004, Sanchez-Archidona y col., 2007*). Sin

embargo, en esta especie todavía no se han empleado los inhibidores de aromatasa en el tratamiento del cáncer mamario.

1.6. Contenido de hormonas esteroides en los tumores mamarios

No existen muchos datos acerca del contenido intratumoral de hormonas esteroides en el CMH (*Perel y col., 1981, Perel y Killinger, 1983, Blankenstein y col., 1999, Chetrite y col., 2000, Liao y Dickson, 2002, Lonning y col., 2009, Haynes y col., 2010*) ni en el CMC (*Peña y col., 2003b, Queiroga y col., 2005, Illera y col., 2006*). Además, todavía no se ha podido esclarecer el significado biológico de esta producción de estrógenos *in situ* con respecto al desarrollo y al comportamiento biológico en el CMH. La mayoría de estudios indican que los estrógenos sintetizados *in situ* vía Arom podrían estimular el crecimiento de forma autocrina y podrían actuar como factores mitogénicos; por lo tanto, esas hormonas podrían suponer una ventaja para el crecimiento de las células cancerígenas, independientemente de las concentraciones séricas de estrógenos (*Perel y col., 1982, Sasano y Harada, 1998, Yue y col., 1999*). También se ha visto que los tejidos mamarios humanos sano y neoplásico contienen y producen varios tipos de andrógenos (*Perel y col., 1981, Perel y Killinger, 1983, Liao y Dickson, 2002*).

Los pocos datos existentes en el CMC con respecto a niveles intratumorales de hormonas esteroides parecen indicar que los niveles intratumorales de hormonas esteroides se incrementan con la malignidad tumoral. (*Peña y col., 2003b, Queiroga y col., 2005, Illera y col., 2006*). Así, se ha visto que el CIC, el CMC más agresivo, contiene niveles elevados de hormonas esteroides (P4, E2, T, SO4E1, A4 y DHEA), en comparación con tumores mamarios no CIC, y se ha propuesto que estas hormonas actúan de forma autocrina y paracrina (*Illera y col., 2003a, Peña y col., 2003a, Peña y col., 2003b, Illera y col., 2006, Sanchez-Archidona y col., 2007, Queiroga y col., 2008*).

1.7. Objetivos

Con el propósito de conocer la validez del CMC como un modelo para el estudio del CMH desde un punto de vista hormonal, los objetivos del Capítulo II fueron comparar la expresión inmunohistoquímica de Arom y diversos receptores hormonales [RE α , RE β , RP y RA], así como analizar los contenidos intratumorales de varias hormonas esteroideas (E2, SO4E1, P4, A4, DHEA y T), y estudiar las posibles asociaciones entre los marcadores anteriormente descritos, utilizando para todo ello muestras de CMH y CMC.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Pacientes y procedimientos clínicos

2.1.1. Especie humana

En este estudio prospectivo se han incluido 51 mujeres que acudieron, a lo largo de un año, a las consultas de Patología Mamaria del Hospital Clínico San Carlos (HCSC) de Madrid y fueron diagnosticadas de cáncer mamario (CMH) (n= 51). Se identificaron las pacientes premenopáusicas (n= 13) y menopáusicas (n= 38). Las pacientes fueron consideradas menopáusicas cuando afirmaron no haber menstruado en los últimos 12 meses. Como controles, se han incluido muestras de GM sin alteraciones (MNH) de 10 mujeres sanas (6 premenopáusicas y 4 menopáusicas) tratadas de reducción mamaria quirúrgica en el Hospital Pardo Aravaca.

En las pacientes con cáncer mamario se llevó a cabo un protocolo de evaluación clínica que se utiliza de forma rutinaria en la consulta de Patología Mamaria del HCSC. Según dicho protocolo se anotan los datos referentes a la edad, raza, sexo y peso, una historia clínica completa y una historia clínica sobre el estado reproductivo (descripción de los ciclos menstruales y/o anomalías de los mismos, edad de menarquia, fecha de último ciclo menstrual, tratamientos hormonales, antecedentes familiares y gestacionales y sobre los tumores mamarios previos o presentes en el momento de la visita). Posteriormente, se lleva a cabo un examen físico general y una exploración detallada de las

glándulas mamarias y ganglios regionales. Para la evaluación más detallada de las lesiones mamarias se emplean diversas técnicas complementarias: mamografía, ecografía, resonancia magnética, punción aspiración con aguja fina, biopsia con aguja gruesa o estereotaxia.

Posteriormente, se realizó la exéresis quirúrgica de las lesiones mamarias y de los ganglios linfáticos regionales cuando fue necesario.

A partir de piezas quirúrgicas de CMH destinadas a estudio histopatológico en el Servicio de Anatomía Patológica del HCSC se obtuvieron muestras tisulares en fresco que fueron procesadas inmediatamente después en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid (HCV-UCM) para técnicas inmunohistoquímicas y estudios de concentraciones hormonales.

Tras el diagnóstico histopatológico de las neoplasias mamarias se determinó el tratamiento más adecuado para cada una de las pacientes, de manera que se administraron tratamientos quimioterápicos y/o paliativos y se realizó un seguimiento clínico hasta el momento del fallecimiento de la paciente o la finalización del presente estudio.

Para clasificar el estadio tumoral de las pacientes se empleó la clasificación tumor-linfonodo-metástasis (*Tumor-Node-Metastases*, TNM). Según los principios generales del sistema de clasificación TNM para los tumores mamarios, descrito por el *American Joint Committee in Cancer* en su *Manual for Staging of Cancer* (Greene y col., 2002, Singletary y col., 2002, Sobin y Wittekind, 2002), se diferenciaron cinco estadios:

- **Estadio 0:** carcinoma *in situ*
- **Estadio I:** proceso local; no hay afectación de ganglios
- **Estadio II:** local avanzado; severa y avanzada invasión local, donde se incluye el cáncer inflamatorio
- **Estadio III:** proceso regional; afectación de 1 o más ganglios regionales

- **Estadio IV:** existencia de metástasis a distancia

Estos procedimientos clínicos no afectaron al estudio que nos ocupa.

Este estudio fue realizado con el entendimiento y consentimiento de cada paciente incluida, así como con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos.

2.1.2. Especie canina

En este estudio prospectivo se han incluido 27 perras que acudieron a la consulta de Oncología Mamaria del HCV- UCM y fueron diagnosticadas de cáncer mamario (CMC). Como controles, se han incluido 7 perras Beagle sanas pertenecientes al animalario del Departamento de Fisiología (Fisiología Animal) de la Facultad de Veterinaria de Madrid, de las que se obtuvo mama normal canina (MNC) por biopsia tru-cut.

En todos los casos se llevó a cabo un protocolo de evaluación clínica de los animales con tumores de mama que se describe en el Capítulo I.

Tras la clasificación clínica de las pacientes, se extirparon los nódulos mamarios mediante: nodulectomía, mastectomía simple, mastectomía regional o mastectomía unilateral completa. El diagnóstico de los tumores mamarios se obtuvo mediante estudio histopatológico de las muestras quirúrgicas.

Tras el diagnóstico histopatológico de los tumores mamarios (*Goldschmidt y col., 2011*) se determinó el tratamiento más adecuado para cada uno de los animales, de manera que se administraron tratamientos quimioterápicos y/o paliativos y se realizó un seguimiento clínico hasta el momento de la eutanasia humanitaria o la finalización del presente estudio. Estos procedimientos clínicos no afectaron al estudio que nos ocupa.

Este estudio fue realizado con la aprobación del Comité de Ética en Experimentación Animal de la UCM y con el consentimiento firmado de todos los propietarios de las perras.

2.2. Procesamiento de muestras

Tras la resección quirúrgica de los tumores, cada mama fue identificada y procesada individualmente. En todos los casos los nódulos fueron separados en dos fragmentos adyacentes, uno para el estudio histopatológico e inmunohistoquímico, y el otro, para la elaboración de macerados tisulares para el estudio de hormonas esteroides.

2.3. Análisis de hormonas esteroides en tejidos

Los niveles de hormonas esteroides se determinaron en los macerados tisulares de los 98 fragmentos de tejido mamario obtenidos (especie humana, CMH n= 51 y MNH n= 10; especie canina, CMC n= 27 y MNC n= 7).

Para la determinación de las concentraciones de hormonas esteroides en las muestras se empleó el método de enzimoimmunoanálisis ELISA de competición, para las hormonas progesterona (P4), 17 β -estradiol (E2), sulfato de estrona (SO4E1), dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona (A4) y testosterona (T), técnica puesta a punto y validada según el método descrito previamente (*Silvan y col., 1993*) en el Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la U.C.M.

Para la obtención de los macerados tisulares se pesó entre 0.1 g y 0.5 g de tejido, se introdujo en un macerador Pobel en trozos pequeños para facilitar su maceración y se añadió 4 ml de solución tampón fosfato salino (PBS), pH: 7,2. Se maceró hasta que desapareció el tejido y el resultado de este procedimiento se incluyó en un tubo de vidrio, que, identificado correctamente, se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos a 4° C (Minifuge RF Heareus); posteriormente se decantó el sobrenadante a tubos de plástico convenientemente etiquetados y se congeló (-80° C) hasta su posterior análisis hormonal.

Las técnica ELISA de competición se detalla a continuación.

2.3.1. Establecimiento de las condiciones óptimas de trabajo, tanto de los anticuerpos como de los conjugados.

Para este estudio, las diluciones seleccionadas y posteriormente utilizadas se resumen en la siguiente tabla:

HORMONA	ANTICUERPO	CONJUGADO
Progesterona	1/2.000	1/40.000
17-β estradiol	1/4.000	1/40.000
Sulfato de estrona	1/4.000	1/40.000
Dehidroepiandrostenediona	1/2.000	1/40.000
Androstenediona	1/4.000	1/20.000
Testosterona	1/8.000	1/40.000

2.3.2. Desarrollo de la técnica ELISA de competición.

Una vez validada la técnica EIA de Competición para la determinación de P4, E2, SO4E1, DHEA, A4 y T, se analizaron las muestras de tejido de las distintas pacientes de las especies humana y canina, utilizándose un método directo sin extracción previa de la muestra para las hormonas SO4E1, DHEA, A4 y T y para P4 y E2 se empleó una técnica de extracción.

El ELISA comprendió las siguientes etapas:

1º Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida (pocillos de la microplaca).

2º Reacción de competición: adición de la muestra o del estándar, y del conjugado.

3º Separación de las fracciones de hormona libre y unida a los anticuerpos en la fase sólida.

4º Adición del sustrato y del cromógeno.

5º Frenado de las placas

6º Lectura y procesado de los resultados.

DESAROLLO DEL ELISA DE COMPETICIÓN

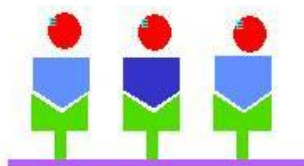
1º



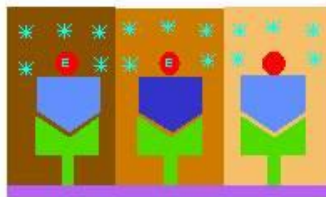
2º



3º



4º



5º



6º



1º Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida:

Los anticuerpos policlonales fueron obtenidos y caracterizados en el Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Veterinaria, U.C.M. (*Illera y col., 1992, Illera y col., 1993, Illera y col., 1997*).

Diluimos el anticuerpo en Coating buffer hasta llegar a la dilución correspondiente. A continuación se tapizan las placas (microplacas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano y una capacidad de 350 µl por pocillo, Immuno 96 MicroWell™ Solid Plates with Maxisorp Surface, *Nunc Brand Products*) con 100 µl de esta solución por pocillo, excepto el pocillo A1 que se deja como blanco. A continuación se sellan las placas con selladores adhesivos de acetato para placas (*ICN Biomedical Inc*) y se incuban a 4 °C durante toda la noche.

Al día siguiente se realizan tres lavados de la placa con solución de lavado (200 µl por pocillo) utilizando un lavador de placas automático (*Anthos Washer Fluido 1WK Model 24 500, Anthos Labtec Instruments*) para eliminar el exceso de anticuerpo que no se ha fijado a la placa y se seca enérgicamente mediante volteo, en papel de filtro. A continuación se añade a todos los pocillos 50 µl de EIA buffer.

2º Reacción de Competición:

Tiene lugar entre la hormona libre (estándar o problema) y la conjugada a la enzima.

El primer paso consistió en la preparación de las muestras para el análisis.

Para la determinación de P4 y E2 se realizó un paso previo de extracción de la hormona del resto de lípidos de los homogenizados tisulares. La P4 se extrajo diluyendo 100 µl de la muestra en 2ml de éter de petróleo. Para determinar el E2 se realizó la extracción diluyendo 100 µl de la muestra en 2ml de dietil éter. Estas mezclas fueron agitadas vigorosamente en un vórtex (*Reax 2.000, Heindolph*) durante 40 segundos y colocadas de inmediato en un baño de metanol y nieve carbónica. Una vez congelado el sedimento, se decantó el sobrenadante

(donde están diluidos todos los esteroides) y se procedió a su evaporación. Tras completarse la evaporación, se añadieron 150 µl de cada solución de conjugado.

Para las hormonas SO₄E1, DHEA, A4 y T en las que se empleó un método directo sin paso previo de extracción, se procedió a la dilución de las muestras en la dilución de conjugado: se añadieron 100 µl de muestra a tubos de ensayo de vidrio, y se disolvieron en 250 µl de la dilución de conjugado apropiada. Después, se homogeneizó cuidadosamente con la ayuda de un agitador.

Una vez preparadas las diluciones de muestra–conjugado, se tapizaron los pocillos de la placa con 50 µl de esta dilución. El tiempo transcurrido entre la dilución de las muestras de plasma en la solución de conjugado y el tapizado de las placas para el desarrollo de la reacción de competición no debe ser superior a 10 minutos. De este modo, se evitan las variaciones de absorbancia observadas en la determinación de una misma muestra, con la consiguiente alteración en la repetibilidad de la técnica de análisis.

Las muestras estándar y problema se determinaron por duplicado y se distribuyeron en la placa de la siguiente forma:

Columna 1: La denominamos EoS; en ella solamente se añadió dilución de conjugado.

Columnas 2-4: En ellas se añadieron las distintas diluciones de las hormonas estándar diluidas en el conjugado (0,1; 0,5; 1; 5; 10, 50; 100, 500 y 1000 pg/100 µl)

Columnas 5-11: En ellas se añadieron 50 µl de las muestras problema (macerado tisular) diluidas en el conjugado.

Columna 12: Se denomina EoE; en ella se añadió dilución de conjugado.

Las placas se sellan, incubándose durante 24 horas a 4 °C, consiguiendo así la amplificación de la unión entre la muestra o los estándares y el anticuerpo.

A continuación se añaden 50 µl de conjugado diluido a la dilución de trabajo óptima en la solución tampón EIA en todos los pocillos. Los conjugados

hormona peroxidasa fueron preparados y caracterizados en el Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Veterinaria, U.C.M. (*Illera y col., 1993, Silvan y col., 1993, Illera y col., 1997*).

De nuevo las placas se sellan, incubándose durante 2 horas a 4 °C.

3º Separación de las fracciones de hormona libre y unida a los anticuerpos adsorbidos en la fase sólida:

Se realizó mediante el volcado de las placas. Se efectuaron cinco lavados con 200 µl de la solución de lavado por pocillo y las placas se secaron perfectamente, antes de añadir el sustrato.

4º Adición del sustrato y del cromógeno:

En todos los pocillos de la placa se añaden 150 µl de sustrato-cromógeno (H₂O₂-Tetrametilbenzidina, Enhanced K Blue, *Neogen*), se sella y se incuba a temperatura ambiente el tiempo necesario según la hormona:

- Sulfato de estrona y testosterona: 5 minutos.
- Estradiol y progesterona: 10 minutos.
- Androstenediona: 30 minutos.

5º Frenado de las placas

Tras el tiempo necesario para que se desarrolle el color del cromógeno, se produce el frenado de la reacción añadiendo 100 µl de una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄, *Panreac*) al 10%.

6º Lectura de las placas:

Una vez finalizado el tiempo de reacción del sustrato, se procedió a la lectura de la densidad óptica del color desarrollado. Esta lectura se realizó en un lector automático EIA (Microplate Reader A4, *Eurogenetics*), que es de lectura bicromática, lo que elimina el color producido por una posible reacción de fondo inespecífica. Los filtros utilizados fueron de 450 y 600 nm.

2.3.3. *Procesamiento de los resultados obtenidos en el análisis hormonal*

El procesado de los resultados, obtenidos del análisis hormonal de las muestras de suero y tejidos, se realizó con la ayuda de un software diseñado especialmente para ello en el Departamento de Informática de la Universidad de Davis (California), y consiste en:

a) Trazado de las curvas patrón

Se realizó enfrentando en el eje de ordenadas la relación $E/E_o \times 100$, es decir, el porcentaje de unión de las muestras estándar con el anticuerpo, y en el eje de abscisas, las concentraciones estándar de cada hormona.

Estas curvas patrón se utilizan de referencia para el cálculo de las concentraciones hormonales de las muestras problema.

b) Cálculo de las concentraciones hormonales de las muestras de plasma y tejidos

El ordenador, tomando como referencia las curvas patrón, calcula las concentraciones de las muestras problema. Se debe introducir un factor de corrección para expresar estas concentraciones en las unidades correctas, ya que las muestras sufren distintas diluciones.

Las concentraciones tisulares de P4, SO4E1, DHEA, A4 y T se expresan en ng/g y de E2 en pg/g.

2.4. Procesamiento de muestras para histopatología

El procesamiento de las muestras para histopatología se realizó de la misma manera que se describe en el Capítulo I.

2.4.1. Diagnóstico histopatológico y grado histológico de malignidad

El diagnóstico histopatológico de los CMH (n= 51) se realizó mediante tinción rutinaria con H-E en el Servicio de Anatomía Patológica del HCSC, empleando la clasificación de la OMS para las neoplasias mamarias humanas (*Lakhani, 2012*). El grado histológico de malignidad (GHM) se estableció empleando el método de Elston y Ellis para el cáncer de mama (*Elston y Ellis, 1991*) ya mencionado en el Capítulo I. Los tumores se clasificaron como grado I, grado II y grado III.

Las muestras de CMC (n= 30) fueron diagnosticadas en el Servicio de Anatomía Patológica del HCV-UCM, empleando la última clasificación para tumores mamarios caninos (*Goldschmidt y col., 2011*). El grado histológico de malignidad tumoral fue determinado como se indica en la Tabla 1 del Anexo I. Los tumores se clasificaron como grado I, grado II y grado III.

2.4.2. Técnicas inmunohistoquímicas

Se empleó la técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa y diversos anticuerpos monoclonales y policlonales. Los anticuerpos empleados, la casa comercial y el tipo de anticuerpo se resumen en la siguiente tabla:

Anticuerpo	Casa comercial	Origen	Dilución empleada	Incubación
REα	C-311: sc-787	Monoclonal	1/50	4°C
	Santa Cruz Biotechnology®			toda la noche
REβ	06-629	Policlonal	1/200	4°C
	Upstate®			toda la noche
RP	1A6	Monoclonal	1/40	4°C
	Novocastra Laboratories®			toda la noche
RA	N-Ab-2	Policlonal	1/100	4°C
	Thermo Scientific®			toda la noche
Aromatasa	Ab35604	Policlonal	1/50	temperatura ambiente
	Abcam®			1h

A continuación se describen detalladamente los anticuerpos empleados, los controles positivos y la metodología, señalando las variaciones para cada anticuerpo.

a) Detección inmunohistoquímica de RE α

1. Desparafinar e hidratar: se desparafina en xilol (10´) y se hidrata mediante pases (de 5-10´) por una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°). Se lavan las preparaciones en agua destilada (5´).

2. Desenmascaramiento antigénico por calor: se someten las preparaciones a un tratamiento con calor en una olla a presión, con 2 l de tampón citrato (10mM, pH= 6,0). Cuando se alcanza la presión máxima, se baja la temperatura del fuego y las preparaciones permanecen durante 2 minutos en la olla antes de abrir. Se dejan enfriar en el citrato durante 30´ a temperatura ambiente.

3. Lavado I: las preparaciones se lavan 5' en agua destilada y 5' en TBS *tween* 0.05% (buffer, pH= 7,4).

4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergen en una solución de H₂O₂ (1,5 ml) en metanol (98,5 ml) durante 15'.

5. Lavado II: se realizan dos lavados de 5' cada uno en agua destilada y otros dos (5') en TBS *tween* 0.05%.

6. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-receptor de estrógenos- α (clon: C-311: sc-787, *Santa Cruz Biotechnology*®), a una dilución 1/50.

7. Lavado III: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS *tween* 0.05%.

8. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo anti-IgG de ratón obtenido en caballo (*Vector*®, BA-2000, dilución 1/400) sobre cada preparación y se incuba durante 30 minutos a temperatura de ambiente.

9. Lavado IV: se realiza igual que el lavado III.

10. Conjugado con estreptavidina: sobre cada preparación se añade un preparado de estreptavidina conjugada con peroxidasa (*Zymed*® 43-4323, dilución 1/400) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.

11. Lavado V: se realiza igual que el lavado III.

12. Revelado: sobre cada preparación se añade una solución cromógena de 3,3'-diaminobencidina (DAB) (*Vector Laboratories*®, cat num: SK-4100).

13. Lavado VI: se lavan las preparaciones con agua corriente durante 5'.

14. Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastan sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 3 minutos.

15. Lavado VII: se lavan las preparaciones en agua corriente durante 10´.

16. Deshidratar y montar: se deshidratan las muestras realizando pases rápidos (30´-1´ cada uno) en una serie de alcoholes ascendentes (70°, 96°, 100°) y se aclaran en xilol. Por último se montan con el medio DPX (*Surgipath®*) y cubreobjetos.

Los controles positivos que se incluyeron en la realización de la técnica fueron secciones de útero canino, con reactividad conocida con el anticuerpo primario empleado. El tejido mamario normal o hiperplásico adyacente a la muestra se empleó como control positivo interno adicional cuando estuvo disponible. Como control negativo de la técnica se sustituyó el anticuerpo primario por un anticuerpo no reactivo.

b) Detección inmunohistoquímica de RE β

Los pasos **1-5** son semejantes a lo descrito para el RE α .

6. Bloqueo de uniones inespecíficas: se añade sobre cada preparación suero normal de cabra (*Dako®*, Glostrup, Denmark, X0907, dilución 1/200 en ambas especies) y se incuba a temperatura de ambiente durante 30´. **7.** Lavado III: se realizan dos lavados de 5´ cada uno en TBS.

8. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo policlonal de conejo anti-receptor de estrógenos- β (cat: 06-629, *Upstate®*), a una dilución 1/200.

9. Lavado IV: se realizan dos lavados de 5´ cada uno en TBS.

10. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo anti-IgG de conejo obtenido en cabra biotinilado (*Dako®*, Glostrup, Denmark, E0432, dilución 1/300) sobre cada preparación y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El resto de pasos es igual que lo referido para la inmunotinción de RE α .

Los controles positivos que se incluyeron en la realización de la técnica fueron secciones de útero canino, con reactividad conocida con el anticuerpo primario empleado. El tejido mamario normal o hiperplásico adyacente a la muestra se empleó como control positivo interno adicional cuando estuvo disponible. Como control negativo de la técnica se sustituyó el anticuerpo primario por un anticuerpo no reactivo.

c) Detección inmunohistoquímica de RP

Se realiza de forma semejante a RE α excepto el siguiente paso:

6. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-progesterona NCL-PGR (clon: 1A6, *Novocastra Laboratories*®), a una dilución 1/40 en ambas especies.

Los controles positivos que se incluyeron en la realización de la técnica fueron secciones de útero canino, con reactividad conocida con el anticuerpo primario empleado. El tejido mamario normal o hiperplásico adyacente a la muestra se empleó como control positivo interno adicional cuando estuvo disponible. Como control negativo de la técnica se sustituyó el anticuerpo primario por un anticuerpo no reactivo.

d) Detección inmunohistoquímica de RA

Se realiza de forma semejante a RE β excepto los pasos siguiente:

6. Bloqueo de uniones inespecíficas: se añade sobre cada preparación suero normal de cerdo (*Dako*®, Glostrup, Denmark, X0901, dilución 1/20) y se incuba a temperatura de ambiente durante 30 minutos.

8. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo policlonal de conejo anti-receptor de andrógenos (clon: N-Ab-2: RB-1358, *Thermo Scientific*®), a una dilución 1/100.

Se utilizaron como controles positivos secciones de próstata de la especie humana y canina, con reactividad comprobada frente al anticuerpo primario empleado. Las glándulas sebáceas normales de la dermis fueron empleadas como control positivo adicional en cada muestra. Como control negativo de la técnica se sustituyó el anticuerpo primario por un anticuerpo no reactivo.

e) Detección inmunohistoquímica de Aromatasa

1. Desparafinado y desenmascaramiento antigénico por calor simultáneo: las secciones de parafina se colocan en un módulo PT (Lab Vision) que contiene una solución tampón de EDTA (pH 8.0) (MAD-004072R/D, Master Diagnostica) y se someten a un tratamiento con calor durante 20 minutos a 95°C de temperatura y posteriormente se enfrían a 60°C.

2. Lavado I: las preparaciones se lavan 5 minutos en agua corriente caliente.

3. Las preparaciones se colocan en un inmunoteñidor automático (Lab Vision Corporation) y se emplea el procedimiento recomendado para el kit de inmunotinción con peroxidasa utilizado (MAD-021881 QK, Ultra Vision Quanto-HRP).

5. Incubación con anticuerpo primario: el inmunoteñidor añade el anticuerpo primario y se incuba una hora a temperatura ambiente. Se empleó el anticuerpo policlonal de conejo anti-citocromo p450 aromatasa (clon: ab35604, Abcam®) a una dilución 1/50.

6. Los lavados, la incubación con el anticuerpo secundario, la conjugación con estreptavidina y el revelado de las muestras se realiza con los

reactivos proporcionados por el fabricante (MAD-021881 QK, Ultra Vision Quanto-HRP).

7. Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastan sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 3 minutos.

8. Lavado VII: se lavan las preparaciones en agua corriente durante 10´.

9. Deshidratar y montar: se deshidratan las muestras realizando pases rápidos (30´´-1´ cada uno) en una serie de alcoholes ascendentes (70º, 96º, 100º) y se aclaran en xilol. Por último se montan con el medio DPX (*Surgipath®*) y cubreobjetos.

Los controles positivos que se incluyeron en la realización de la técnica fueron muestras placenta humana y ovario canino. Como control negativo de la técnica se sustituyó el anticuerpo primario por un anticuerpo no reactivo.

2.4.3. Valoración de las inmunotinciones

Para valorar la inmunotinción de los receptores hormonales y Arom se siguieron las indicaciones del método de valoración Allred (*Allred y col., 1998*), que evalúa las muestras con una puntuación determinada (*total score-TS*) de acuerdo al porcentaje de células positivas (*Percentage Score-PS*) y la intensidad de la inmunotinción (*Intensity Score-IS*).

La valoración se llevó a cabo mediante la evaluación de las tinciones descritas por dos observadores que desconocían la clasificación histológica de los tejidos en el momento de la observación. Una muestra fue considerada positiva a Arom y los receptores hormonales cuando la puntuación total fue superior a 3 ($TS > 3$; más del 10% de células tumorales con el citoplasma positivo a la inmunotinción de Arom o el núcleo positivo a la inmunotinción de cada receptor hormonal).

El método empleado se detalla a continuación:

Método de valoración Allred para las muestras examinadas	
PS	Porcentaje de células teñidas
PS 0	Sin teñir
PS 1	< 1 %
PS 2	1% - 10%
PS 3	10% - 33%
PS 4	33% - 66%
PS 5	> 66%
IS	Intensidad de la inmunotinción
IS 0	Sin tinción
IS 1	Tinción intensidad débil
IS 2	Tinción intensidad moderada
IS 3	Tinción intensidad fuerte
TS	Puntuación total
TS = PS + IS	0,2,3,4,5,6,7,8

2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el apoyo del Centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid, mediante el empleo del programa estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, IL, USA) versión 19.0 para *Windows*.

Se establecieron tres grupos para las comparaciones de los tejidos tumorales: muestras humanas premenopáusicas (CMH-PM) / muestras humanas menopáusicas (CMH-M) / muestras caninas (CMC). Para las determinaciones hormonales, también se añadieron los grupos control de cada especie.

Se analizaron las distintas variables categóricas con sus categorías que se describen a continuación:

- estado menopáusico (premenopáusica/menopáusica) (en la mujer),

- grado histológico de malignidad (I/II/III),
- Arom y receptores hormonales (negativo/positivo).

Las variables numéricas analizadas fueron:

- TS de Arom y receptores hormonales
- concentraciones tisulares de P4, SO4E1, DHEA, A4 y T en ng/g y de E2 en pg/g.

Para el análisis descriptivo de las variables numéricas (TS para Arom y receptores hormonales, niveles de hormonas esteroides en tejido mamario) se usó el valor medio, la mediana, la desviación estándar de la media, el mínimo y el máximo. Los resultados fueron expresados en forma de media \pm error estándar. En el análisis descriptivo de las variables categóricas se obtuvieron las frecuencias y los porcentajes de las categorías.

La relación existente entre las variables categóricas fue evaluada empleando el método de chi-cuadrado (χ^2) de Pearson. La relación entre las variables categóricas y las continuas fue estudiada mediante los test de tipo T (comparación entre los dos grupos especie humana/canina o comparación CMH-PM/CMC y CMH-M/CMC). La relación existente entre las variables continuas se analizó mediante la correlación de Pearson.

Las asociaciones fueron consideradas significativas para los valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Características epidemiológicas y clínicas

3.1.1. Especie humana

En este estudio se han incluido de forma prospectiva muestras tisulares de 51 mujeres con cáncer de mama (CMH) y 10 muestras de tejido mamario humano sano provenientes de 10 mujeres diferentes que ejercieron de donantes

voluntarias Las características epidemiológicas y clínicas de las mujeres control y con cáncer mamario (CMH) incluidas en este estudio se resumen a continuación:

Características epidemiológicas y clínicas de las mujeres del estudio	Grupos	
	Control (n= 10)	CMH (n= 51)
Edad (media)	43,4 años (rango 23-63)	63,3 años (rango 33-89)
Estado reproductivo		
Premenopáusica	6 (60 %)	13 (25,5 %)
Menopáusica	4 (40 %)	38 (74,5 %)
Tamaño tumoral		
T ₁ (< 3 cm)		33 (64,7 %)
T ₂ (3-5 cm)		14 (27,5 %)
T ₃ (>5 cm)		4 (7,8 %)
Ulceración tumoral		
No		51 (100 %)
Sí		0 (0 %)
Metástasis ganglionar		
No		31 (60,8 %)
Sí		20 (39,2 %)
Metástasis a distancia		
No		49 (96,1 %)
Sí		2 (3,9 %)
Estadio clínico		
0		3 (5,9 %)
I		19 (37,2 %)
II		9 (17,6 %)
III		18 (35,3 %)
IV		2 (3,9 %)

3.1.2. Especie canina

Para la realización de esta investigación se recogieron 34 muestras de tejido mamario fresco de 27 perras de diversas razas con cáncer mamario no inflamatorio (CMC) y se obtuvieron 7 muestras de tejido mamario canino sano de 7 hembras adultas de raza Beagle sin historia de patología mamaria ni endocrina.

Las características epidemiológicas y clínicas de las perras control y con cáncer mamario (CMC) incluidas en este estudio se describen a continuación:

<i>Características epidemiológicas y clínicas de las perras del estudio</i>	<i>Grupos</i>	
	Controles (n= 7)	CMC (n= 27)
Edad (media)	8,1 años (rango 6-10)	10,1 años (rango 6-14)
Raza		
Pura	7 (100 %)	20 (74,1 %)
Mestizo	0 (0 %)	7 (25,9 %)
Estado reproductivo		
Entera	7 (100 %)	26 (98 %)
Castrada	0 (0 %)	1 (2 %)
Tamaño tumoral		
T ₁ (< 3 cm)		11 (40,7 %)
T ₂ (3-5 cm)		5 (18,6 %)
T ₃ (>5 cm)		11 (40,7 %)
Ulceración tumoral		
No		22 (81,5 %)
Sí		5 (18,5 %)
Metástasis ganglionar		
No		20 (74,1 %)
Sí		7 (25,9 %)
Metástasis a distancia		
No		26 (96,3 %)
Sí		1 (3,7 %)
Estadio clínico		
I		11 (40,7 %)
II		5 (18,5 %)
III		4 (14,8 %)
IV		6 (22,2 %)
V		1 (3,7 %)

3.2. Diagnóstico histopatológico

3.2.1. Especie humana

El estudio histopatológico de las muestras de cáncer mamario humano reveló varios subtipos de carcinoma mamario: carcinoma ductal invasivo (n= 38), carcinoma mucinoso (n= 5), carcinoma lobular invasivo (n= 4), carcinoma papilar invasivo (n= 2) y carcinoma tubular (n= 2). No se observó ninguna alteración histológica del tejido mamario obtenido de las donantes voluntarias.

3.2.2. Especie canina

Dentro del grupo de los 27 CMC se diagnosticaron distintos tipos de tumores: carcinoma tubular (n= 7), carcinoma tubulopapilar (n= 5), carcinoma sólido (n= 5), carcinoma complejo (n= 3), carcinoma de tipo mixto (n= 3), carcinoma adenoescamoso (n= 2), carcinoma rico en lípidos (n= 1) y carcinoma anaplásico (n= 1). No se observó ninguna alteración histológica en las muestras de tejido mamario obtenidas de las 7 perras Beagle empleadas como controles.

3.3. Valoración inmunohistoquímica de aromatasa y receptores hormonales

Las muestras de tejido mamario sano, tanto de la especie humana como canina, fueron positivas para todos los marcadores estudiados.

La inmunotinción de Arom fue citoplásmica en las células epiteliales neoplásicas y heterogénea dentro del mismo tumor en ambas especies. En los tejidos mamaros sanos de ambas especies la tinción de Arom fue débil y homogénea. El resto de marcadores estudiados (RE α , RE β , RP y RA) presentaron positividad nuclear con heterogeneidad variable; la heterogeneidad de la tinción dentro del mismo tumor fue más evidente en el RE α y RP, y en las muestras de CMC.

La inmunoexpresión de Arom y receptores de hormonas esteroides ($RE\alpha$, $RE\beta$, RP y RA) en los tres grupos estudiados [muestras humanas premenopáusicas (CMH-PM) / muestras humanas menopáusicas (CMH-M) / muestras caninas (CMC)] se muestran en la Fig. 1 del Anexo II y se resumen en la Tabla 1 del Anexo II.

La inmunoexpresión de Arom fue similar en CMH con respecto a CMC. En el grupo CMH, los tumores positivos a Arom fueron más frecuentes en el grupo de mujeres menopáusicas que en el de premenopáusicas, aunque esta asociación no alcanzó el nivel significativo ($p = 0,15$) (86,8% Arom + en CMH-M vs. 69,2% en CMH-PM; 13,2% de Arom- en CMH-M vs. 30,8% de Arom- en CMH-PM).

Todos los receptores esteroides se expresaron más en los grupos de CMH que en el grupo CMC. La diferencia más llamativa fue la mayor expresión de $RE\alpha$ en CMH-PM (TS, $p < 0.001$; % de tumores positivos, $p = 0.002$) respecto al CMC. La inmunotinción de $RE\beta$ fue mayor en el grupo CMH-PM respecto al CMC (TS, $p = 0,003$). El RP se expresó más en el grupo de CMH-M que en el CMC (TS, $p = 0,003$). El RA se expresó más en ambos grupos de mujeres (TS; CMH-PM $p = 0,001$, CMH-M $p < 0,0001$) que en el CMC.

3.4. Concentraciones hormonales en los homogeneizados tumorales

Los niveles tisulares de hormonas en los homogeneizados tumorales y mamas control se detallan en la Tabla 2 del Anexo II.

Los niveles tisulares de E2, SO_4E_1 , P4, A4 y T fueron significativamente mayores en las muestras malignas en comparación con el tejido mamario sano en los tres grupos estudiados (CMH-PM, CMH-M y CMC). Los niveles de DHEA fueron también mayores en todos los grupos de malignidad, aunque no de forma significativa en el grupo CMC-PM.

3.5. Asociaciones significativas entre los marcadores estudiados

3.5.1. Asociaciones de aromatasa

En los CMH en conjunto la inmunexpresión de Arom (-/+) estuvo asociada de forma significativa al RE α (TS y -/+) y RA (TS) como se detalla a continuación: 85,4% (35/41) de los tumores Arom+ fueron ER α + ($p = 0,015$); por el contrario, la media del TS del RA en los tumores Arom + fue significativamente menor que la de los tumores Arom- (valor de TS de RA de $6,44 \pm 0,20$ para tumores Arom+ vs. $7,60 \pm 0,31$ para tumores Arom-; $p = 0,005$).

También en el grupo CMH en conjunto existió una asociación positiva entre la expresión de Arom (-/+) y los niveles tisulares de DHEA ($p = 0,016$).

Además, en el grupo de mujeres premenopáusicas, se observó una asociación significativa entre la Arom (-/+) y los niveles de SO4E1: los tumores Arom+ tuvieron mayor cantidad de SO4E1 que los tumores Arom- (media de SO4E1 $1403,15 \pm 196,27$ ng/g en tumores Arom+ vs. $837,75 \pm 57,06$ ng/g en tumores Arom-; $p = 0,021$).

En el grupo de mujeres menopáusicas existió una correlación negativa entre los TS de Arom y RA ($p = 0,036$).

En el grupo de CMC, la inmunexpresión de Arom (-/+) estuvo significativamente asociada con la inmunexpresión del RE β (-/+) (94,7%, 18/19, de los tumores Arom+ fueron también RE β +) ($p = 0,031$) y con la del RP (-/+) (94,7%, 18/19, de los tumores Arom+ fueron RP+, mientras que el 75% (3/4) de los tumores RP- fueron Arom- ($p = 0,031$); asimismo, existió una correlación positiva entre los TS de Arom y RE β ($p = 0,041$) y los TS de Arom y RP ($p = 0,018$).

3.5.2. Asociaciones de receptores hormonales

En el grupo CMH se observaron numerosas asociaciones de los receptores entre sí. Hubo una fuerte asociación positiva entre la inmunexpresión del RE α

(TS y -/+) y el RP (TS y -/+) (todos los valores de $p < 0,001$). Esta correlación positiva entre los TS de RE α y RP ($p = 0,010$) también se observó en el grupo de mujeres premenopáusicas considerándolo por separado. En los CMH en conjunto, el RE β (TS y -/+) se asoció de forma positiva con el RA (TS) ($p < 0,001$ y $p = 0,003$ respectivamente). Así mismo, el RE β (TS) se asoció de forma negativa con varias hormonas tisulares como se detalla a continuación: con P4 ($p = 0,024$), con E2 ($p = 0,032$) y con SO4E1 ($p = 0,002$); en todas ellas, a mayor TS del RE β , menor nivel tisular de estas tres hormonas, y viceversa. Esta asociación negativa también se observó entre el RA (TS) y las hormonas E2 y SO4E1 (ambos valores de $p < 0,001$). En las mujeres pre-menopáusicas, los tumores RP+ tuvieron un contenido menor de T que los tumores RP- (media de T de $24,04 \pm 2,30$ ng/g en tumores RP+ vs. $41,02 \pm 8,69$ ng/g de T en tumores RP-; $p = 0,020$). De la misma manera, la correlación de Pearson fue fuertemente positiva entre los TS de RE α y RP ($p = 0,003$) en el grupo de mujeres menopáusicas. En este mismo grupo se observó asimismo una fuerte correlación positiva entre el RE β (TS) y el RA (TS) ($p < 0,001$). Por otro lado, tanto el RE β (TS) como el RA (TS) estuvieron correlacionados de forma negativa con los niveles de SO4E1 en los macerados tisulares ($p = 0,007$ y $p = 0,042$, respectivamente).

En el grupo de CMC, existieron varias correlaciones positivas entre los distintos receptores hormonales: entre RE α (-/+ y TS) y el RA (TS) ($p = 0,043$ y $p = 0,038$, respectivamente), entre el RE β (TS) y el RP (TS) ($p = 0,002$) y entre el RE β (-/+) y el RA (-/+) ($p = 0,036$). Además, la presencia de los receptores hormonales se asoció con diversas hormonas esteroideas tisulares: existió correlación negativa entre el RE α (TS) y los niveles tisulares de T ($p = 0,033$) y de DHEA ($p = 0,014$). También existió correlación negativa entre el RE β (TS) y los niveles de T ($p = 0,022$). Asimismo, el RP (TS) se correlacionó de forma negativa con la SO4E1 ($p = 0,005$) y la T tisular ($p = 0,034$). Y por último, curiosamente, los tumores RA- contenían niveles más elevados de A4 que los tumores RA+ (niveles de A4 de $137,18 \pm 0,03$ ng/g en tumores RA- vs. $94,05 \pm 12,08$ ng/g de A4 en tumores RA+; $p = 0,002$).

3.5.3. Asociaciones entre hormonas esteroideas en los macerados tisulares

En lo que respecta a las asociaciones encontradas entre las hormonas tisulares, existió una correlación positiva entre T y DHEA en el grupo CMH-PM ($p = 0.032$). En el CMC, la T estuvo positivamente correlacionada con el SO4E1 ($p < 0.001$) y con la A4 ($p = 0.007$). Además, en el grupo CMC la A4 también se correlacionó de forma positiva con los niveles de DHEA ($p = 0.017$).

Las similitudes y diferencias entre el CMH y el CMC con los diferentes marcadores analizados se resumen en la Tabla 3 del Anexo II.

Así mismo, las asociaciones significativas entre aromatasa, receptores y concentraciones hormonales en las neoplasias de los distintos grupos se detallan en la siguiente tabla:

Grupo		p
CMH	Arom +	↑REα (TS) 0,042
		REα + 0,015
		↓RA (TS) 0,005
		↑DHEA 0,016
	REα+	↑RP (TS) <0,001
		RP+ <0,001
	↑REα (TS)	↑RP (TS) <0,001
		RP + <0,001
	REβ+	↑RA (TS) 0,003
	↑REβ (TS)	↑RA (TS) <0,001
		↓P4 0,024
		↓E2 0,032
		↓SO4E1 0,002
	↑RA (TS)	↓E2 < 0,001
		↓SO4E1 < 0,001

<i>Grupo</i>			<i>p</i>
CMH-PM	Arom +	↑SO4E1	0,021
	↑RE α (TS)	↑RP (TS)	0,010
	PR+	↓T	0,020
	↑T	↑DHEA	0,032
CMH-M	↑Arom (TS)	↓RA (TS)	0,036
	↑RE α (TS)	↑RP (TS)	0,003
	↑RE β (TS)	↑RA (TS)	<0,001
		↓SO4E1	0,007
	↑RA (TS)	↓SO4E1	0,042
CMC	Arom+	RE β +	0,031
		RP+	0,031
	↑Arom (TS)	↑RE β (TS)	0,041
		↑RP (TS)	0,018
	RE α +	↑RA (TS)	0,043
	↑RE α (TS)	↑RA (TS)	0,038
		↓T	0,033
		↓DHEA	0,014
	RE β +	RA+	0,036
	↑RE β (TS)	↑RP (TS)	0,002
		↓T	0,022
	↑RP (TS)	↓SO4E1	0,005
		↓T	0,034
	RA+	↓A4	0,002
	↑T	↑SO4E1	<0,001
		↑A4	0,007
	↑A4	↑DHEA	0,017

Los resultados de este Capítulo II se discuten de forma conjunta en el apartado de Discusión General.

CAPÍTULO III

Incremento de expresión inmunohistoquímica de
aromatasa en el cáncer mamario inflamatorio canino: una
potencial diana terapéutica

VII. CAPÍTULO III

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Introducción

El cáncer mamario inflamatorio (CI) es un tipo de cáncer mamario especialmente agresivo que se da tanto en la especie humana (CIH) como en la especie canina (CIC) y que posee diferentes características genéticas, biológicas y clínicas con respecto al resto de los tumores mamarios (*Jaiyesimi y col., 1992, Tavassoli, 1999a, Perez Alenza y col., 2001, Giordano, 2003*). A pesar de que su incidencia es baja [en la mujer varía entre el 1 y 6% de todos los cánceres mamarios (*Jaiyesimi y col., 1992*) y en la perra la incidencia es del 7,6% (*Perez Alenza y col., 2001*)], se ha observado un incremento de su prevalencia en ambas especies en las últimas décadas. Este hecho unido a que las tasas de supervivencia siguen siendo bajas a pesar de los avances realizados en el tratamiento del CIH (*Dawood y col., 2011*), ha forzado a los investigadores a buscar las características específicas de este tipo de cáncer en comparación con otros cánceres “no inflamatorios”. A pesar de ello, el CIH y el CIC son todavía los tipos de cáncer mamario más agresivos tanto en la especie humana (*Gonzalez-Angulo y col., 2007, Hirko y col., 2013*) como en la canina (*Perez Alenza y col., 2001, Marconato y col., 2009*).

Todavía no se conocen ampliamente los mecanismos responsables de su comportamiento tan agresivo, del mal pronóstico y de la rápida evolución de esta enfermedad en ambas especies. Entre estos mecanismos, se cree que la angiogénesis exacerbada, la linfangiogénesis y la marcada linfangioinvasión, características del fenotipo inflamatorio, son de gran relevancia (*Jaiyesimi y col., 1992, Pérez-Alenza y col., 2001, Clemente y col., 2010b, Clemente y col., 2013*). Se han identificado dos tipos de CIH (*Taylor y Meltzer, 1938*) y de CIC (*Pérez-Alenza y col., 2001*): el primario (sin historia previa de cáncer mamario) y el secundario (que se desarrolla tras un cáncer mamario previo no inflamatorio). En general, el diagnóstico de CIH (*Tavassoli, 1999a*) o de CIC (*Susaneck y col., 1983, Pérez-Alenza y col., 2001, Peña y col., 2003a*) se sospecha por las características clínicas, que incluyen presentación repentina, edema, hiperemia,

dureza, ulceración de la piel y calor, y es confirmado histológicamente por la presencia de embolización masiva de células neoplásicas dentro de los vasos linfáticos de la dermis superficial. Esta invasión linfovascular de la dermis provoca el bloqueo linfático y sería la responsable del edema y del alto potencial metastático del CIH (*Tavassoli, 1999b, Dawood y col., 2011*) y del CIC (*Clemente y col., 2013*).

El CIC se ha propuesto como el mejor modelo espontáneo animal para el estudio de la enfermedad humana, ya que presenta numerosas características semejantes, una mayor prevalencia que el CIH y mayor disponibilidad de muestras a través de las necropsias, generalmente sin tratamiento quimioterápico previo (*Peña y col., 2003a*).

Se ha establecido recientemente una nueva línea celular de CIC que se ha denominado IPC-366 (*Cáceres y col., 2015*). IPC-366 es una línea celular de tipo basal triple negativa (RE α -, RP- y HER-2-, altamente tumorigénica y metastásica *in vivo* que reproduce las características histológicas del CIC primario (*Cáceres y col., 2015*).

1.2. Características histopatológicas del cáncer mamario inflamatorio

El cáncer mamario inflamatorio no se corresponde con un tipo histológico específico de carcinoma mamario en la mujer (*Taylor y Meltzer, 1938, Haagensen, 1971, Droulias y col., 1976*) ni en la perra (*Peña y col., 2003a*). En el CIH la presentación del carcinoma inflamatorio mamario se ha asociado normalmente con el tipo histológico carcinoma ductal infiltrativo (casi siempre bien diferenciado), pero además se han asociado otros tipos como carcinoma lobular infiltrativo, carcinoma medular, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células largas indiferenciadas (*Jaiyesimi y col., 1992, Resetkova, 2008*). La experiencia del MD Anderson Cancer Center (Houston, Universidad de Tejas) refleja que el tipo de carcinoma más frecuente que origina CIH es multicéntrico y con un patrón de arquitectura micropapilar, al menos de forma focal (*Resetkova, 2008*). Alrededor de dos tercios de los casos de CIH son de alto GHM, una proporción mayor que la que se observa en casos de tumores mamarios no CI

(*Delarue y col., 1981, Jaiyesimi y col., 1992*), con células tumorales pleomórficas y figuras mitóticas atípicas (*Rosen, 1996*).

Inicialmente, la descripción patológica de esta enfermedad se vio influenciada por la necesidad de explicar los hallazgos clínicos característicos del CIH. Bryant en el año 1887, fue el primero en observar una invasión de los vasos linfáticos de la dermis por émbolos carcinomatosos. Tras este hallazgo, Bryant elitió la hipótesis de que la obstrucción causada por la invasión tumoral de los vasos linfáticos producía las características clínicas típicas de los pacientes con CI mamario como eritema, calor, aumento difuso del tamaño, dolor, firmeza y edema (*Bryant, 1889*). Teniendo en cuenta este descubrimiento, Ellis y Teitelbaum propusieron en el año 1974, que el carcinoma inflamatorio mamario sería categorizado patológicamente en base a un “distintivo histológico” como la presencia de émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis, sugiriendo así que la enfermedad cambiara su nombre de carcinoma inflamatorio por el de “carcinomatosis linfática dérmica” (*Ellis y Teitelbaum, 1974*). Sin embargo, posteriormente se han publicado diversos estudios en los que se demuestra que los émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis no están presentes en todos los casos de pacientes de CI mamario, si no que aparecen en un 50-75% de las pacientes (*Charpin y col., 1992, Bonnier y col., 1995, Resetskova, 2008*). Por otro lado, Saltzstein describió en el año 1974 el término de “carcinoma inflamatorio oculto”, que hace referencia a un CIH en el que la afectación de los vasos linfáticos de la dermis se confirma mediante examen histológico, pero, sin embargo, no existen signos clínicos de inflamación. Este tipo de CIH oculto parece ser que precede a la presentación clínica característica de CI (*Saltzstein, 1974*).

Por otro lado, se puede observar microscópicamente la invasión de la dermis por parte del carcinoma fuera de los vasos linfáticos, característica que no es muy común en el CIH mamario primario, pero sí es más frecuente en el secundario (*Kleer y col., 2000*).

A pesar del nombre por el que se le conoce, el carcinoma inflamatorio de mama no tiene evidencias patológicas de inflamación, rara vez se puede observar un infiltrado inflamatorio de linfocitos y monocitos en las zonas perivasculares

como respuesta al bloqueo linfático por las células tumorales. La aparición de neutrófilos, eosinófilos o mastocitos, no es común en el estroma peritumoral (Kleer y col., 2000, Resetkova, 2008).

La piel mamaria de los pacientes con CIH muestra a menudo alteraciones histológicas, como un ensanchamiento de la capa dérmica del colágeno reticular, debido a un incremento del colágeno y del edema (Resetkova, 2008).

Las características que se han indicado en el CIH, se encuentran también en el CIC. Presenta semejantes características clínicas, los tipos primario y secundario y también existe el CIC “oculto” (Pérez-Alenza y col., 2001, Peña y col., 2003a). Todos los CIC son de elevada malignidad histológica (GHM III) como se describe a continuación y se caracterizan por la presencia de émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis superficial, también en aproximadamente un 75-80% de los casos (Peña y col., 2003a, Millanta y col., 2009). Presentan una formación de túbulos y pleomorfismo variables. En el 40% de los casos, se pueden encontrar células tumorales gigantes multinucleadas. El índice mitótico es generalmente elevado y en un 70% de los casos se observan mitosis atípicas. Las áreas de necrosis están presentes en la mitad de los casos de CI y pueden ser moderadas o extensas. Entre el 21% y el 35% de los CIC presentan estructuras tipo “comedo”, que se encuentran formados por una zona de necrosis/apoptosis central en el interior de una formación tubular tumoral. También se suele observar una marcada fibrosis perivascular alrededor de los vasos linfáticos (50% de los casos) y en ocasiones (30%), existen hemorragias evidentes (Peña y col., 2003a).

En cuanto a la presencia de células inflamatorias (linfocitos, células plasmáticas y macrófagos) en el CIC, si excluimos las áreas ulceradas, ésta es moderada en el 85% de los casos y escasa en el resto, observándose en la zona perivascular y perilinfática e infiltrando la dermis (Peña y col., 2003a, Millanta y col., 2009).

En la piel afectada por CIC, se observa frecuentemente hiperplasia e hiperqueratosis de la epidermis y queratosis de los folículos pilosos (Susaneck y col., 1983, Peña y col., 2003a, Millanta y col., 2009). Además de embolizarse, el

tumor invade la dermis en un 80% de los casos aproximadamente (*Peña y col., 2003a*) y se observan émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis en el 74% al 100% de los casos (*Peña y col., 2003a, Millanta y col., 2009*). Los vasos linfáticos que no presentan émbolos, suelen aparecer dilatados (linfangectasias) y existe edema en la dermis (*Susaneck y col., 1983, Pérez-Alenza y col., 2001, Peña y col., 2003a, Millanta y col., 2009*).

Según describieron Peña y col. (2003a), se distinguen dos patrones histológicos diferentes de infiltración del CIC la dermis: un patrón túbulo-papilar con estructuras tubulares o papilares bien definidas (62%) y un patrón sarcomatoso, caracterizado por una infiltración difusa formada por células aisladas de elevada malignidad histológica (anaplásicas), de aspecto similar a un sarcoma (37%). Este tipo histológico de infiltración de la dermis se asocia estadísticamente con el tipo clínico de CIC primario o secundario. Así, el CIC primario presenta generalmente el tipo histológico de infiltración sarcomatosa, siendo el de mayor malignidad histológica. Además de una mayor frecuencia de comedocarcinomas, existe una relativa mayor proporción de carcinomas ricos en lípidos. En estos últimos, el área de invasión tumoral en la dermis ofrece una imagen muy semejante a un liposarcoma. El tejido muscular infiltrado por la neoplasia suele presentar degeneración (depósito de sustancia hialina), atrofia o necrosis y mostrar un grado variable de edema intersticial y de células inflamatorias (macrófagos y linfocitos) como parte de la reparación tisular. El músculo necrosado se sustituye frecuentemente por tejido adiposo.

En todos los casos se observan metástasis en los ganglios regionales (*Susaneck y col., 1983, Pérez-Alenza y col., 2001, Peña y col., 2003a*). En algunos animales con CIC la metástasis es tan agresiva que reemplaza totalmente el tejido linfoide (*Peña y col., 2003a, Millanta y col., 2009*). En los carcinomas ricos en lípidos, las células con vacuolas lipídicas se observan metastatizando en los ganglios, pero no se han encontrado en las metástasis pulmonares (*Peña y col., 2003a*).

1.3. Receptores hormonales en el cáncer mamario inflamatorio

El CIH puede presentar cualquier combinación de receptores hormonales, pero es frecuente que sean negativos al RE y al RP (*Dawood y col., 2011*). Si se consideran estos receptores por separado, la mayoría de los CIH mamarios son RE negativos (53%-100% de los casos) (*Tavassoli, 1999b*) y RP negativos (66-84% de los casos) (*Delarue y col., 1981, Kokal y col., 1985, Paradiso y col., 1989, Maloisel y col., 1990*). De hecho, la falta de expresión del RE es uno de los 5 parámetros que se ha asociado a la marca inmunofenotípica del CIH (*Hahnel y col., 1971*).

En el cáncer mamario humano y también en el CIH, la ausencia de RE y RP se asocia a un periodo libre de enfermedad corto y a una supervivencia menor (*Charafe-Jauffret y col., 2008, Zell y col., 2009*). En las mujeres con cánceres mamarios no inflamatorios, la supervivencia a los cinco años después del diagnóstico es del 91% en aquellas con tumores RE α + y del 77% en aquellas con tumores RE α - (*Anderson y col., 2005*). Esta influencia sobre el pronóstico es aún más evidente en los casos de CIH, puesto que la supervivencia de mujeres con tumores RE+ es del 48,5% y la de mujeres con tumores RE- es del 25,3% (*Anderson y col., 2005*).

En la actualidad, no hay estudios respecto a la expresión de Arom ni de RE β en CIH. La enzima aromatasa en el cáncer mamario ha sido revisada previamente en el Capítulo II. Aunque no existen publicaciones respecto a RE β en CIH se comienza a estudiar en otros CMH no inflamatorio y se ha visto en varias ocasiones que la expresión del RE β en el CMH, independientemente de la expresión de RE α , está asociada a una mayor respuesta a la terapia endocrina (*Murphy y Leygue, 2012, Dey y col., 2013*).

Recientemente se ha documentado la expresión de RA in CIH, viendo que el 39% de los CIH son positivos a RA, y aproximadamente un tercio de los tumores RE α y RP negativos son positivos a RA; además la expresión de este receptor se asoció a la existencia de invasión linfovascular (*Gong y col., 2014*).

Los estudios respecto a los receptores hormonales en CIC son escasos (*Peña y col., 2003a, Illera y col., 2006, Sanchez-Archidona y col., 2007, Millanta y*

col., 2009, Clemente y col., 2010b). En el CIC existe una mayoría de casos RE- y positivos a RE β y RA. En el estudio de Illera y col (2006) mediante inmunohistoquímica y utilizando un grupo de CIC en comparación con un grupo de tumores mamarios malignos no CI (de diversos grados de malignidad) se observó que el 100% de los CIC eran negativos a RE mientras que el resto de tumores malignos eran negativos a este receptor en un 90% de los casos (no significativo).

La expresión observada del RP en el CIC fue de un 71-73% y se asoció a la presentación secundaria de la enfermedad, mientras que su ausencia se relacionó con la existencia de metástasis pulmonares (*Peña y col., 2003a, Clemente y col., 2010b*). Los CIC positivos al RP tienen generalmente un mejor pronóstico y supervivencia (*Peña y col., 2003a*). En otro estudio, no se encontró positividad al RE ni al RP en ningún carcinoma inflamatorio mamario canino analizado (*Millanta y col., 2009*).

El RE β se expresó intensamente en CIC sin que existieran diferencias significativas respecto a tumores malignos no CI (93% frente a 81% (*Illera y col., 2006*). Así mismo se detectó inmunoexpresión del receptor de andrógenos (RA) en un 93-95% de los CIC, incluso las células infiltrantes altamente malignas o las células metastásicas fueron positivas al RA, frente al 80-84% encontrado en tumores mamarios malignos no-CI (*Illera y col., 2006*).

1.4. Objetivos

Dadas las diferencias anteriormente descritas en la expresión de receptores esteroides en el CIC, los diferentes niveles hormonales de estos tumores en comparación con otros CMC no CI y la mayor expresión de Arom en los tumores CI (ver revisión bibliográfica del Capítulo II), se ha propuesto la existencia de un mecanismo endocrino diferente como uno de los mecanismos responsables del fenotipo inflamatorio en la especie canina (*Peña y col., 2003b, Illera y col., 2006*). Por ello, y para poder definir las diferencias específicas en la patogénesis del fenotipo inflamatorio, especialmente en lo que respecta a la síntesis de esteroides y sus receptores, y para probar la validez de la Arom como

una molécula diana en el tratamiento del CIC, los objetivos del presente capítulo fueron 1) estudiar la expresión inmunohistoquímica de Arom y diversos receptores hormonales (RE α , RE β , RP y RA) en muestras de cáncer mamario canino no inflamatorio de grado III (CMC no CI) y de CIC; 2) estudiar las posibles asociaciones entre Arom y los receptores estudiados, así como con características clínicas (castración y tipo de CIC) y 3) evaluar los efectos del fármaco letrozole en los crecimientos de las líneas celulares de CIC IPC-366 y de CIH SUM-149.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Pacientes y procedimientos diagnósticos

Para este estudio retrospectivo se seleccionaron incluyeron 40 perras que acudieron a la consulta de Oncología Mamaria del HCV-UCM. En total se obtuvo un total de 21 casos de CIC y 19 casos con cáncer mamario canino no-CI (CMC-no CI). Sólo se incluyeron en este estudio neoplasias mamarias clasificadas con GHM III (*Peña y col., 2013*).

En todos los pacientes se llevó a cabo un protocolo de evaluación clínica ya referido en el Capítulo I.

El diagnóstico clínico del CIC se estableció en la consulta y atendió a las características clínicas descritas en la mujer (*Tavassoli, 1999a*) y en la perra (*Susaneck y col., 1983, Pérez-Alenza y col., 2001*): crecimiento rápido del tumor con afectación de forma difusa de múltiples glándulas mamarias (con la presencia o ausencia de nódulo mamario) formando una placa firme, con calor en la zona, edema, eritema, y dolor. En los pacientes con sospecha de CMC clínico, no se realizó mastectomía (ya que está contraindicada) y se llevó a cabo la toma de biopsia con aguja tru-cut.

Las características clínicas y epidemiológicas de las perras incluidas en este estudio se describen a continuación. La edad de los animales diagnosticados con CIC incluidos en el estudio varió entre los 7y los 15 años, con una media de

10,85 años. En el grupo CMC-no CI las edades estuvieron comprendidas entre los 3 y los 16 años, con una edad media de 11,35 años. La distribución de raza (76,2% de animales de pura raza en el grupo CI y 73,7% en el grupo CMC-no CI) y el estado reproductivo (80,9% de las perras del grupo CI estaban enteras y el 94,7% del grupo CMC-no CI) fueron similares en ambos grupos. También se registró el tipo de CI (primario: sin historia previa de tumor mamario, n=10; secundario, después de un tumor mamario maligno previo, n=8; desconocido, n=3).

El diagnóstico histopatológico se llevó a cabo a partir de piezas quirúrgicas o de biopsias “tru-cut” incisionales. . El procesamiento de las muestras para realizar el diagnóstico histopatológico y determinar el grado histológico de malignidad se describe en el Capítulo I.

Todas las neoplasias mamarias malignas que se incluyeron tenían características de alta malignidad histológica (grado histológico de malignidad III) (*Peña y col., 2013*). El diagnóstico histopatológico de CI se estableció cuando existió embolización masiva de células tumorales en los vasos linfáticos de la dermis superficial, de acuerdo con lo previamente publicado en la perra (*Peña y col., 2003a*).

Todos los casos de CIC de este estudio tuvieron diagnóstico clínico e histopatológico de CI.

Dentro del grupo de los 19 CMC-no CI se diagnosticaron distintos tipos de tumores: carcinoma sólido (n=7), carcinosarcoma (n=4), carcinoma anaplásico (n=2), epiteloma maligno (n=2), carcinoma tubular (n=1), carcinoma complejo (n=1), sarcoma (n=1) y osteosarcoma (n=1). Los tumores tipo CI se diagnosticaron como: comedocarcinoma (n=7), carcinoma rico en lípidos (n=5), carcinoma anaplásico (n = 4), carcinoma sólido (n=2), carcinoma tubulopapilar (n=2) y carcinoma adenoescamoso (n=1).

Este estudio fue realizado con la aprobación del Comité de Ética en Experimentación Animal de la UCM y con el consentimiento firmado de todos los propietarios de las perras.

2.2. Estudio inmunohistoquímico de Arom, RE α , RE β y RA.

Para el estudio inmunohistoquímico de aromatasa y receptores hormonales se emplearon 40 muestras mamarias (19 CMC-no CI y 21 CI).

En este estudio se realizaron las mismas técnicas inmunohistoquímicas que las descritas en el Capítulo II. Asimismo, para la valoración de las inmunotinciones se siguieron las indicaciones del método de valoración Allred (*Allred y col., 1998*) como se describe en el Capítulo II.

2.3. Cultivo de líneas celulares IPC-366 y SUM-149; efecto antitumoral de letrozole *in vitro*

La línea celular IPC-366, una línea celular de CIC triple negativa recientemente establecida por nuestro grupo (*Caceres y col., 2015*), se cultivó en el medio *Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM/F12)* suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Sigma Aldrich), 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina) y 1% de L-glutamina (Sigma Aldrich).

La línea celular SUM-149 (Asterand plc), una línea celular CIH triple negativa previamente establecida, se mantuvo en medio Ham's F-12 suplementado con 10% de FBS (Sigma Aldrich), 1 μ g/ml de hidrocortisona, 5 μ g/ml de insulina y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina) (Sigma Aldrich).

Ambas líneas celulares se cultivaron con una densidad de $1,5 \times 10^6$ células en frascos de cultivo de 75 cm² y se mantuvieron en atmósfera humidificada con 5% de dióxido de carbono a 37°C. El seguimiento del crecimiento y viabilidad celular se realizó diariamente mediante la observación directa de las células al microscopio invertido.

El letrozole (4,4'-[(1H-1,2,4-triazol-1-yl) methylene] bis-benzonitrile) (solución de stock 10mM; Sigma Aldrich), un inhibidor de la enzima Arom, se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) se almacenó a -20°C y, posteriormente, se diluyó en medio de cultivo fresco inmediatamente antes de usarlo. Los cultivos de IPC-366 y SUM-149 se dividieron en el grupo control (concentración final de

DMSO <0,1%) y grupos experimentales en los cuales se añadieron al medio de cultivo soluciones con las distintas concentraciones de letrozole (0,35, 0,70 y 1,05 $\mu\text{mol/l}$). Todos los cultivos se dejaron proliferar 72 horas. Los contajes celulares se llevaron a cabo empleando un hemocitómetro a las 24, 48 y 72 horas tras la adición del fármaco al medio de cultivo. Cada experimento se llevó a cabo 5 veces. Los contajes se expresaron como número de células $\times 10^6$.

2.4. Análisis de viabilidad celular

Se realizó un análisis de la viabilidad celular empleando el *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Promega). En resumen, las células son cultivadas en placas de 96 pocillos en una densidad de 20.000 células por pocillo. En el momento del análisis, se desechó el medio de cultivo en el que han crecido las células y se añadieron 100 μl de medio con 20 μl de MTS añadidos a cada pocillo e incubados durante 3 horas a 37°C con un 5% de dióxido de carbono. Las placas se leyeron a una absorbancia de 490nm con un lector de placas *SpectraMax 190 UV/Vis*. Las células que no recibieron tratamiento se consideraron como un 100% de proliferación y todas las células tratadas con letrozole se expresaron en relación a éstas.

2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el apoyo del Centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid, mediante el empleo del programa estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, IL, USA) versión 19.0 para *Windows*.

Se establecieron dos grupos para las comparaciones de los tejidos tumorales: CIC y CMC-no CI. Se analizaron las distintas variables categóricas con sus categorías que se describen a continuación: estado reproductivo (castrada/entera), tipo de CIC (primario/secundario), Arom y receptores hormonales (TS y negativo/positivo). Para el análisis descriptivo de las variables

continuas (TS para Arom y receptores hormonales) se usó el valor medio, la mediana, la desviación estándar de la media, el mínimo y el máximo. Los resultados fueron expresados en forma de media \pm error estándar. En el análisis descriptivo de las variables categóricas se obtuvieron las frecuencias y los porcentajes de las categorías.

La relación existente entre las variables categóricas fue evaluada empleando el método de chi-cuadrado (χ^2) de Pearson. La relación entre las variables categóricas y las continuas fue estudiada mediante los test de tipo T. La relación existente entre las variables continuas se analizó mediante la correlación de Pearson.

Se empleó el Test de Wilcoxon para las comparaciones en los experimentos de adición de letrozole a las líneas celulares IPC-366 y SUM-149.

Las asociaciones fueron consideradas significativas para los valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Expresión inmunohistoquímica de Arom y receptores hormonales

La immunoexpresión de Arom y receptores de hormonas esteroides (RE α , RE β , RP y RA) se muestran en la Tabla 1 del Anexo III.

3.1.1. Aromatasa

La inmunotinción de Arom fue de localización citoplásmica y granular en las células neoplásicas y heterogénea dentro de la misma sección tumoral. Las células del stroma mostraron una reacción positiva variable. La media del TS de Arom fue significativamente mayor en el grupo CIC que en el grupo CMC-no CI ($5,57 \pm 0,55$ vs. $3,53 \pm 0,69$, respectivamente, $p = 0,025$) (Fig. 2 del Anexo III).

3.1.2. Receptor de Estrógenos α

Los núcleos de las células neoplásicas epiteliales, mioepiteliales y mesenquimatosas fueron positivas a este receptor, con una marcada distribución e intensidad heterogéneas dentro de la misma muestra tumoral. La mayoría de las neoplasias de ambos grupos fue negativa a la inmunotinción del RE α .

3.1.3. Receptor de Estrógenos β

La inmunotinción del RE β se detectó en los núcleos de las células neoplásicas (epiteliales y mioepiteliales) y del estroma (fibroblastos, miofibroblastos y endoteliales), con una distribución muy heterogénea de las células positivas en cada muestra tumoral. El tejido cartilaginoso y el tejido óseo de los tumores mixtos fueron negativos a la inmunotinción. Al comparar los grupos CIC vs. CMC-no CI, la media del TS del RE β disminuyó significativamente en el grupo CMC-no CI ($6,1 \pm 0,3$ vs. $4,68 \pm 0,57$, respectivamente, $p = 0,038$). Todas las muestras CIC fueron positivas a este receptor (21/21, 100%) (Fig. 3 del Anexo III), mientras que sólo 16/19 (81,25%) de los CMC-no CI expresaron el RE β ($p = 0,058$).

3.1.4. Receptor de Progesterona

La inmunotinción al RP se observó en los núcleos de las células neoplásicas y del estroma (de las muestras CIC y CMC-no CI). La media de TS de RP obtenida en los tumores CIC fue significativamente mayor que la media de TS de RP del grupo CMC-no CI ($4,76 \pm 0,58$ vs. $3,05 \pm 0,53$; respectively, $p = 0,004$) (Fig. 4 del Anexo III). Sin embargo, se obtuvo un porcentaje similar de tumores positivos al RP en ambos grupos.

3.1.5. Receptor de Andr6genos

El RA mostr6 inmunotinci6n en los n6cleos de las c6lulas neopl6sicas y del estroma (fibroblastos y miofibroblastos) en todas las muestras CIC y CMC-no CI (Fig. 3 del Anexo III). Sin embargo, la distribuci6n del receptor fue heterog6nea en las c6lulas neopl6sicas. En el grupo CIC, se observ6 una inmunotinci6n intensa al RA en las c6lulas altamente malignas aisladas que invadían la dermis. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresi6n del RA entre los dos grupos estudiados.

3.2. Asociaciones de la inmunotinci6n de Aromatasa

En el grupo CIC, el TS de Arom se asoci6 al tipo de CIC como se describe a continuaci6n: la media del TS de Arom de los CIC secundarios fue estadísticamente mayor que la de los CIC primarios ($6,88 \pm 0,44$ vs. $4,30 \pm 0,94$; respectivamente, $p = 0,029$). Adem6s, todos los CIC secundarios (8/8, 100%) fueron calificados como positivos a la tinci6n de Arom, mientras que s6lo el 60% de los CIC primarios (6/10) fueron positivos a la tinci6n de Arom.

El estado reproductivo no se asoci6 a la inmunotinci6n de Aromatasa. Por otro lado, el TS de RE α mostr6 cierta tendencia hacia la asociaci6n significativa con la inmunotinci6n de Arom (-/+), ya que la media del TS de RE α fue mayor en los tumores positivos a Arom que en los tumores negativos a Arom ($p = 0,083$).

En el grupo CMC-no CI, se encontr6 la siguiente asociaci6n inversa entre el RP (-/+) y la Arom (TS): la media del TS de Arom fue m6s elevada en los tumores RP- que en los tumores RP+ ($6,20 \pm 0,8$ vs. $2,57 \pm 0,75$ respectivamente; $p = 0,007$). Adem6s, todos los tumores RP- (5/5, 100%) fueron Arom+, mientras que s6lo el 50 % (7/14) de los tumores RP+ fueron tambi6n Arom+. ($p = 0.047$).

Estas asociaciones pueden consultarse en la Tabla 2 del Anexo III.

3.3. Efecto antitumoral y viabilidad celular de letrozole *in vitro*

La adición de letrozole a los medios de cultivo de IPC-366 y SUM-149 disminuyó los contajes celulares en todas las dosis estudiadas, incrementándose este descenso de los contajes con la dosis y el tiempo posterior al tratamiento (ver Fig.5 del Anexo III). De forma parecida, los resultados de viabilidad celular mostraron una reducción del porcentaje de viabilidad en ambas líneas celulares. Las mayores reducciones se observaron en la dosis más alta de letrozole a las 72 horas posteriores al tratamiento en ambas líneas IPC-366 y SUM-149 (ver Fig.6 del Anexo III)

Los resultados correspondientes a este Capítulo III se discuten de forma conjunta en el apartado denominado Discusión General.

CAPÍTULO IV

Elevación de los niveles de interleucinas 8 y 10 como
hallazgos característicos del cáncer mamario inflamatorio
canino

VIII. CAPÍTULO IV

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Las interleucinas en el cáncer mamario humano y canino

Las citocinas son una gran familia de proteínas solubles que juegan un papel muy importante en la inflamación, la inmunidad y la homeostasis tisular. Las interleucinas (ILs) son un tipo de citocinas que median la comunicación entre leucocitos (Coico y col., 2003). Una nueva hipótesis cada vez más aceptada sugiere que las ILs podrían participar en el desarrollo del cáncer como agentes potenciales de modificación de la angiogénesis y de la infiltración leucocitaria (Chavey y col., 2007). Se ha visto que pueden actuar como factores de crecimiento paracrinós o autocrinós en diversos tipos de cáncer humano y que su presencia se realciona con un peor pronóstico (Angelo y Kurzrock, 2007).

Durante los últimos años, el papel de las citocinas en el cáncer mamario humano ha sido investigado ampliamente. En las neoplasias mamarias las ILs son producidas por losmacrófagos y loslinfocitos que infiltran los tumores pero además también pueden ser segregadas por las células mamarias neoplásicas (Wilson y Balkwill, 2002, Freund y col., 2003).

A pesar de los avances que se han realizado en el estudio de estas moléculas en el cáncer mamario humano, no existen muchos estudios de este tipo en el cáncer mamario de la especie canina. Se sabe que las citocinas tienen un doble efecto (promotor o inhibitorio) sobre la progresión tumoral al unirse a sus receptores específicos (Chavey y col., 2007) y se han llevado a cabo algunos estudios para analizar su posible uso en terapias antitumorales, como por ejemplo, el tratamiento de diversas neoplasias caninas, entre ellas mamarias, mastocitomas o tumores de la vejiga urinaria, con la IL-2 o el factor de necrosis tumoral (Moore y col., 1991, Konietzschke y col., 2012, Ziekman y col., 2013, Den Otter y col., 2015).

Se ha visto que los tumores mamarios de alto grado de malignidad de la especie humana contienen altos niveles de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) y *Macrophage Inflammatory*

Protein-1 β (MIP-1 β) y además se ha comprobado que los tumores mamarios humanos muy neovascularizados expresan altos niveles de IL-8 (*Chavey y col., 2007*): Es interesante señalar que este mismo resultado se detectó en un biomodelo de CIH en ratón (*Shirakawa y col., 2001*).

Los niveles de IL-1, una de las citocinas proinflamatorias más potentes, están elevados en pacientes con cáncer (*Dinarelli, 1996*). La IL-1 juega un papel importante en el crecimiento tumoral en etapas tempranas y en la formación de metástasis a través de la producción de otros mediadores de invasión y angiogénesis (*Apte y col., 2006, Lewis y col., 2006*). Además, como también los adipocitos producen IL-1, podría existir participar en el desarrollo de cáncer mamario en mujeres posmenopáusicas con obesidad (*Perrier y col., 2009*).

La IL-6 es otra citoquina proinflamatoria que promueve el crecimiento tumoral favoreciendo la producción de proteínas antiapoptóticas y angiogénicas en las células tumorales y además, estimula la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de estrógenos y regula la actividad de aromatasa en las células de cáncer de mama (*Purohit y col., 2002*). Por otra parte, también se ha demostrado una posible influencia de la IL-6 en el desarrollo de las metástasis, ya que se ha visto que la IL-6 estimula la motilidad de las células tumorales y disminuye la adhesión celular en líneas celulares de cáncer de mama (*Verhasselt y col., 1992, Asgeirsson y col., 1998, Arihiro y col., 2000*).

Existen escasos estudios sobre ILs en tumores mamarios caninos. Empleando técnicas inmunohistoquímicas se ha indicado que existe una mayor expresión de IL-1 y de IL-6 en tumores malignos y metastásicos que en tumores benignos (*Kim y col., 2010*).

La IL-8, quemoquina también conocida como CXCL8, podría tener un papel clave en la invasión y angiogénesis del cáncer mamario (*Lin y col., 2004*). La angiogénesis es un proceso complejo en el que están implicados numerosos mediadores celulares como el factor de crecimiento de endotelio vascular (en inglés, *vascular endothelial growth factor*, VEGF). En estudios realizados con líneas celulares de cáncer mamario humano se ha señalado una clara relación entre una alta expresión de IL-8 y de VEGF (*Chelouche-Lev y col., 2004*); además, los tumores muy vascularizados también expresaron altos niveles de IL-

8 (*Chavey y col., 2007*). Asimismo, se ha demostrado que las células endoteliales, principales células en responder a la angiogénesis, expresan los dos receptores conocidos de la IL-8 (*Miller y col., 1998*).

A pesar de todos estos datos publicados en el cáncer mamario de la especie humana, un reciente estudio de Zuccari y col. (2011) en tumores mamarios caninos otorga un papel protector a la IL-8 dado que existió un descenso en la expresión del RNA mensajero de esta interleucina en los tumores mamarios malignos en comparación con el tejido mamario normal.

La IL-10, citoquina que disminuye la respuesta inmune (*Coico y col., 2003*), está implicada en el proceso de inmunosupresión tumoral (*Khong y Restifo, 2002*).

Tanto el suero como muestras tumorales de mujeres con cáncer mamario contienen grandes cantidades de IL-1, IL-6 e IL-8. Además, se ha visto correlación entre niveles serológicos elevados de IL-6, IL-8 e IL-10 en pacientes con cáncer de mama y un estado clínico avanzado y un peor pronóstico (*Reed y col., 1992, Merendino y col., 1996, Kozłowski y col., 2003, Knupfer y col., 2004, Chavey y col., 2007, Lyon y col., 2008*).

En los últimos años la investigación en el CIH y canino ha crecido en gran medida, no obstante, no ha habido grandes hallazgos en cuanto a los niveles y el papel de las citocinas en este tipo de cáncer mamario.

A pesar de haber sido nombrado “cáncer inflamatorio”, los tumores de este tipo producen cantidades insignificantes de citocinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral y la IL-1 y la IL-12 (*Kleer y col., 2000, Resetskova, 2008*). Por otro lado, este tipo de cáncer tiene una gran capacidad angiogénica y angiointensiva (*Van der Auwera y col., 2004*). En líneas celulares y muestras tisulares de CIH se ha señalado una gran expresión y secreción de VEGF y de las ILs IL-6 y la IL-8 (*Kleer y col., 2000*). Además, los niveles de IL-8 en el suero de un biomodelo de CIH en ratón y en el medio de cultivo de células de CIH fueron mayores que los encontrados en los análogos con células de cáncer mamario no CI (*Shirakawa y col., 2001*). Sin embargo, algunos resultados son contradictorios ya que la cuantificación de los niveles de expresión de distintas citocinas llevada a cabo por Bieche y col. (2004) mediante PCR a tiempo real en

muestras tumorales de CIH, en comparación con muestras de cáncer de mama localmente avanzado, sólo obtuvo sobre-expresión del gen IL-6 pero no de otras interleucinas proinflamatorias, confirmando que el fenotipo “inflamatorio” de esta patología es debido al bloqueo de los vasos linfáticos por la presencia de émbolos tumorales y no a la infiltración de células inflamatorias.

En la bibliografía consultada, no se han encontrado estudios previos que investiguen los niveles de ILs en el CIC y existen muy pocos datos en los TMC en general; se ha demostrado la presencia de estas moléculas en tres recientes estudios con resultados contradictorios (*Kim y col., 2010, Zuccari y col., 2011, Gelaleti y col., 2012*).

Para lograr un mayor entendimiento de la patogénesis del CI, en especial en lo que respecta al papel de varias interleucinas en la génesis tumoral, y para evaluar la validez del CIC como un modelo animal para el estudio del CIH, los objetivos del Capítulo IV fueron analizar los niveles de varias interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10) en suero y muestra de tejido tumoral de perras con tumores mamarios benignos y malignos, incluyendo casos de cáncer mamario inflamatorio.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Animales y procedimientos clínicos

En este estudio prospectivo se incluyeron 41 perras que acudieron a la consulta de Oncología Mamaria del HCV-UCM. Los animales se agruparon de la siguiente forma: perras con cáncer mamario inflamatorio (CIC) (n=7), animales con cáncer mamario no inflamatorio (CMC-no CI) (n=24) y animales con tumores mamarios benignos e hiperplasias (TMBH) (n=10). En todos los casos se llevó a cabo un protocolo de evaluación clínica, diagnóstico y tratamiento de animales tal como se describe en los Capítulos I y III.

Como controles, se incluyeron 7 perras Beagle sanas (con edades comprendidas entre los 7 y los 10 años) pertenecientes al animalario del

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal) de la Facultad de Veterinaria de la UCM, de las que se obtuvo suero y mama normal (MN) por biopsia tru-cut.

Las características clínicas y epidemiológicas de las perras incluidas en este estudio se incluyen en la Tabla 1 del Anexo IV.

Este estudio fue realizado con la aprobación del Comité de Ética en Experimentación Animal de la UCM y con el consentimiento firmado de todos los propietarios de las perras.

2.2. Toma de muestras

Para el estudio de interleucinas se emplearon 48 muestras mamarias (7 MN, 10 TMBH, 24 CMC-no CI y 7 CIC) y las correspondientes muestras de suero (7 sueros controles-SC, 10 muestras de perras con TMBH, 24 sueros de perras con CMC-no CI y 7 sueros de perras con CIC) que fueron recogidas de forma prospectiva durante 2 años para el análisis de ILs. Todas las muestras histopatológicas procesaron y diagnosticaron en el servicio de Anatomía Patológica del HCV-UCM. Las muestras mamarias (n=48) se dividieron en dos fragmentos adyacentes, una parte fue procesada para histopatología y la otra se mantuvo en congelación (-80°C) hasta que más tarde se homogeneizó por maceración para analizar el contenido de ILs. La toma de sangre fue previa a ningún tratamiento quimioterápico, terapia hormonal o radioterapia. El día de la cirugía, antes de la administración de fluidos o medicamentos, se realizó una punción venosa para la obtención de sangre en un tubo sin anticoagulante. Las muestras fueron identificadas, centrifugadas y el suero fue decantado y almacenado individualmente (-80°C) hasta la realización de los análisis.

2.3. Histopatología

Los tejidos que se destinaron a histopatología se fijaron en formalina, se incluyeron en bloques de parafina y se cortaron en secciones de 3 µm. El diagnóstico de los tumores y el establecimiento del grado histológico de malignidad se realizó de acuerdo a lo descrito anteriormente en el Capítulo I.

Las neoplasias mamarias malignas incluidas en el estudio tuvieron características de alta malignidad histológica (grado histológico de malignidad III) (Peña y col., 2013). La confirmación histopatológica de los CI se basó en la presencia de émbolos en los vasos linfáticos de la dermis, como se ha descrito previamente (Peña y col., 2003a).

2.4. Técnica de detección de interleucinas

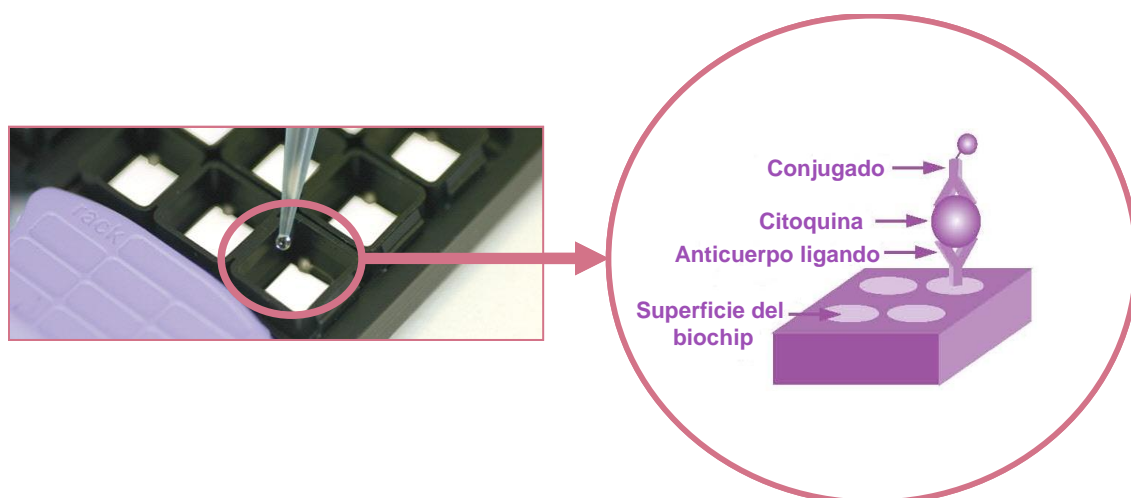
2.4.1. Preparación de las muestras

Los macerados tisulares se obtuvieron siguiendo la técnica descrita en Capítulo II. Los niveles de ILs en tejido se expresaron en pg/g.

En las muestras de suero los niveles de ILs se determinaron sin realizar ningún tratamiento previo en las muestras. Los niveles de ILs en suero se expresaron en pg/ml.

2.4.2. Principios de la técnica de detección de interleucinas

Se analizó la concentración de las interleucinas: interleucina (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, en las muestras de suero y macerado, utilizando el Evidence Investigator™ (Randox Laboratories Ltd.), un analizador semiautomático basado en el uso de un biochip como plataforma de reacción (Biochip Array Technology), en el Hospital de la Paz de Madrid. Esta tecnología permite una detección cuantitativa simultánea de múltiples moléculas a partir de una única muestra. Tiene una cámara CCD (*cooled charge coupled device*) y usa un software de procesamiento de imagen para leer los resultados. El Evidence Investigator™ para el análisis de factores de crecimiento utiliza los principios básicos de un ELISA tipo sandwich. El biochip es un sustrato sólido de 9 mm² con múltiples ligandos específicos del agente a detectar, unidos en regiones predefinidas en la superficie de la matriz. Las proteínas de la muestra reaccionan específicamente con los anticuerpos fijados al biochip y con los anticuerpos marcados con peroxidasa (HRP) que añadimos como conjugado, como se observa en la siguiente figura:



Al añadir el sustrato, compuesto por luminol y peróxido, se produce la emisión de una señal quimioluminiscente. La señal de luz generada por cada región del biochip es detectada y medida simultáneamente con la cámara usando una tecnología de imagen digital. El software interpreta la imagen y calcula la concentración de la proteína a estudiar presente en cada muestra comparando con la curva de calibrado.

2.4.3. Desarrollo de la técnica de detección de interleucinas

1. Calibrar el aparato insertando el disco de calibración y leyendo los códigos de barras
2. Identificar los biochips y las muestras que se van a dispensar en cada pocillo (1 biochip contiene 9 pocillos para muestras/controles/calibradores)
3. Pipetear 200 μ l de diluyente de ensayo por pocillo
4. Pipetear 100 μ l de muestra, control o calibrador por pocillo y mezclar agitando
5. Incubar durante 1 hora a 37°C y 370 rpm en el termoagitador
6. Tras la incubación, retirar los biochip del termoagitador y vaciar su contenido

7. Realizar un ciclo de 2 lavados rápidos añadiendo con un bote de lavado 350 µl de la solución de lavado en cada pocillo sin mezclar el contenido de distintos pocillos

8. Realizar un ciclo de 4 lavados dejando la solución de lavado en los pocillos durante 2 minutos en cada lavado. Tras el último lavado retirar toda la solución de lavado.

9. Pipetear 300 µl de conjugado por pocillo

10. Incubar durante 1 hora a 37°C y 370 rpm en el termoagitador

11. Tras la incubación, retirar los biochip del termoagitador y vaciar su contenido

12. Realizar un ciclo de 2 lavados rápidos añadiendo con un bote de lavado 350 µl de la solución de lavado en cada pocillo sin mezclar el contenido de distintos pocillos

13. Realizar un ciclo de 4 lavados dejando la solución de lavado en los pocillos durante 2 minutos en cada lavado. Tras el último lavado retirar toda la solución de lavado.

14. Pipetear 250 µl de sustrato por pocillo e incubar durante 2 minutos exactos protegiéndolo de la luz

15. Introducir el biochip en el Evidence Investigator™ para que el software capture las imágenes

16. Los resultados son procesados automáticamente por el software.

Las concentraciones serológicas de todas las citocinas se expresan en pg/ml y las tisulares se expresan en pg/g.

2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el apoyo del Centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid, mediante el empleo del programa estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, IL, USA) versión 19.0 para *Windows*.

Se establecieron cuatro grupos para las comparaciones de los niveles de interleucinas: controles/TMBH/CMC-no CI/CIC. Los resultados obtenidos tras el análisis de interleucinas se expresaron como variables continuas en suero y macerado tisular de cada paciente; expresándose las concentraciones serológicas de todas las interleucinas en pg/ml y las tisulares en pg/g.

Para el análisis descriptivo de las variables continuas se usó el valor medio, la mediana, la desviación estándar de la media, el mínimo y el máximo. Los resultados fueron expresados en forma de media \pm error estándar. En el análisis descriptivo de las variables categóricas se obtuvieron las frecuencias y los porcentajes de las categorías.

Las diferencias significativas en los niveles de ILs entre los cuatro grupos fueron estudiadas mediante los test de Análisis de la Varianza (ANOVA). En los ANOVAS, después del test F global, que muestra si hay diferencias significativas globalmente entre las medias, se realizó la prueba de Duncan que hace contrastes específicos entre las medias.

Las asociaciones fueron consideradas significativas para los valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Diagnósticos histopatológicos

Dentro del grupo de TMBH se diagnosticaron distintos tipos de lesiones: adenoma intraductal papilar (n=1), hiperplasia lobular mamaria (n=2), adenoma complejo (n=3) y tumor mixto benigno (n= 4). Los siguientes subtipos de carcinoma se diagnosticaron en el grupo de CMC-no CI: anaplásico (n=1), sólido (n=5) y tubulopapilar (n=18). Los tumores tipo CIC se diagnosticaron como: carcinoma sólido y tubulopapilar (n=4), carcinoma anaplásico (n=1), carcinoma rico en lípidos (n=1) y carcinosarcoma (n=1). Las muestras de mama normal (n=7) obtenidas de los Beagles no presentaron ningún signo de alteración histológica.

3.2. Niveles de interleucinas en homogeneizados tumorales

Se observó un aumento de los niveles de interleucinas con la malignidad tumoral, tal como se describe a continuación: en los homogeneizados tumorales los niveles de IL-6 e IL-10 fueron más altos en los tumores malignos (CIC y no inflamatorio) en comparación a los tumores benignos y displasias y en comparación con las mamas normales; los niveles tumorales de IL-8 fueron más altos en los tumores mamarios malignos en comparación con la mama normal. Los niveles de IL-10 en homogeneizado tumoral estuvieron más elevados en los tumores CI que en los tumores CMC-no CI.

Los niveles de ILs en los homogeneizados tumorales se muestran en la Tabla 2 del Anexo IV.

3.3. Niveles séricos de interleucinas

En el grupo CIC, todos los niveles séricos de ILs, excepto los de IL-1 β , estuvieron más elevados que en los sueros controles. Además, los niveles séricos de IL-8 e IL-10 estuvieron significativamente más elevados en el grupo CIC que en el resto de los grupos. Los niveles serológicos de IL-1 α fueron más elevados en los grupos de malignidad (CIC y CMC-no CI) que en los grupos TMBH y sueros control.

Se pueden consultar los niveles serológicos de ILs en la tabla 3 del Anexo IV.

Los resultados de este Capítulo IV se discuten en conjunto en el apartado denominado Discusión General.

DISCUSIÓN GENERAL

IX. DISCUSIÓN GENERAL

Los tumores espontáneos en perros ofrecen una oportunidad única para el estudio del cáncer, pues se desarrollan en un entorno compartido con los humanos. Estudios oncológicos comparativos demuestran que estos animales pueden tener las claves para numerosos avances en tratamientos para el cáncer humano (*Knapp y Waters, 1997*). La especie canina ha sido propuesta como modelo natural de estudio de los tumores de mama, en especial del carcinoma inflamatorio mamario, dado que dichas neoplasias presentan numerosas similitudes en las características clínicas y patológicas con los tumores mamarios humanos (*MacEwen, 1990, Pérez-Alenza y col., 2001, Peña y col., 2003a, Antuofermo y col., 2007*). Además, el modelo canino tiene las ventajas de que los tumores progresan más rápidamente que en los humanos y que las muestras, generalmente, no han recibido tratamientos previos.

Este trabajo de Tesis Doctoral presenta la realización de cuatro investigaciones relacionadas cuyo objetivo general consistió en comparar diversos aspectos entre el cáncer mamario humano y canino con especial referencia al cáncer mamario inflamatorio para conocer la validez del cáncer mamario canino como modelo para el estudio del cáncer mamario humano.

En primer lugar se evaluó el valor pronóstico de un sistema de gradación de neoplasias mamarias adaptado a la especie canina. En el segundo estudio se analizaron diversos parámetros hormonales para encontrar similitudes y diferencias entre el cáncer mamario humano y el canino. En el tercer trabajo se trata de encontrar diferencias de inmunoeexpresión de la enzima aromatasa y receptores hormonales entre el cáncer inflamatorio mamario canino (CIC) y otros tipos de cáncer mamario canino. En el último estudio se trata de valorar posibles cambios en el contenido de interleucinas en el CIC respecto a otros tipos tumorales benignos y malignos no CI.

1. EL GRADO HISTOLÓGICO DE MALIGNIDAD ADAPTADO A LA ESPECIE CANINA COMO FACTOR PRONÓSTICO

En este apartado se completó y evaluó el sistema de gradación histológica de carcinomas mamarios caninos adaptado por Peña y publicado parcialmente en 2010 y 2011 (*Goldschmidt y col., 2011*). Aunque previamente existían otros estudios que evaluaban algunos aspectos de este método (*Clemente y col., 2010a, Goldschmidt y col., 2011, Rasotto y col., 2014*), esta es la primera vez que dicho método de gradación se ha publicado en su totalidad incluyendo las explicaciones de cómo evaluar el grado en los tumores con proliferación mioepitelial (tumores complejos y mixtos). Este sistema de gradación es una modificación del método Nottingham ampliamente utilizado en medicina humana (*Elston y Ellis, 1991*), que a su vez es la modificación del método de Richardson (*Bloom y Richardson, 1957*).

Se han propuesto numerosos factores de pronóstico epidemiológicos, clínicos e histológicos como predictores fiables del desarrollo del cáncer mamario canino (CMC) (*Lana y col., 2007, Sorenmo y col., 2011*). La mayoría de esos factores se han evaluado en estudios retrospectivos sin un seguimiento clínico riguroso de los animales (*Sorenmo y col., 2011*). En las enfermedades frecuentes, como es el caso del CMC, los factores pronóstico deben demostrar su habilidad de predecir el desenlace en estudios prospectivos bien controlados (*Webster y col., 2011*). Por otra parte, como hay muchas variables que pueden influenciar la supervivencia y confundir las asociaciones entre los marcadores pronóstico de interés y la supervivencia, es muy importante el poder justificar estas variables mediante el empleo de análisis multivariantes (*Webster y col., 2011*). Sin embargo, la mayoría de los factores pronóstico del CMC evaluados en los estudios previamente publicados se han analizado empleando análisis univariantes (*Webster y col., 2011*). Y lo que es más, muchos de esos factores pierden su habilidad pronóstica como factores independientes cuando se emplean análisis multivariantes.

El sistema de gradación histológica empleado en medicina humana para el CMH (*Elston y Ellis, 1991*) se ha aplicado a los CMC en numerosas ocasiones (*Peña y col., 1998, Karayannopoulou y col., 2005, Matos y col., 2006, Millanta y*

col., 2006a, Millanta y col., 2006b, Gama y col., 2008b, de Oliveira y col., 2009, Gama y col., 2010, Santos y col., 2010, Hermo y col., 2011, Santos y col., 2011). Sin embargo, estos estudios no han podido aplicar el método de gradación humano en las áreas de proliferación mioepitelial, aun cuando dichos estudios incluían tumores complejos y carcinosarcomas. En una de las publicaciones mencionadas (*Karayannopoulou y col., 2005*) se encontró asociación entre la gradación histológica humana y la supervivencia en el análisis univariante prospectivo. Sin embargo, en 2 estudios prospectivos previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (*Peña y col., 1998, Nieto y col., 2000*) este mismo sistema de gradación histológica no resultó ser un factor de pronóstico independiente del CMC en los necesarios análisis estadísticos multivariantes. También se ha visto que hay un sistema para evaluar el grado de infiltración de los CMC (*Gilbertson y col., 1983*) que tiene valor pronóstico en estudios multivariantes prospectivos (*Sarli y col., 2002, Sassi y col., 2010*).

En el presente estudio de cohorte multivariante, los CMC se diagnosticaron empleando la reciente clasificación histológica de TMC que incluye varios nuevos subtipos (*Goldschmidt y col., 2011*). En otro estudio (*Rasotto y col., 2012*) dicha clasificación se ha aplicado de forma retrospectiva en una serie de 245 carcinomas mamarios caninos y se comparan los dos métodos de gradación histológica de los TMC: el método de Misdorp (*Misdorp, 2002*) y el de Peña (*Clemente y col., 2010a*). Los resultados del estudio de Rasotto y col.(2012) y el presente no son comparables en cuanto a los porcentajes de tipos histológicos y de grados probablemente por la selección retrospectiva de casos que Rasotto y col realizaron (2012). También es importante considerar las diferencias halladas entre las poblaciones de perros de ambos trabajos: en el estudio de Rassotto y col. (2012), el 44,9% de las perras estaban castradas a diferencia de nuestro trabajo en el que sólo un 20% de perras estaban castradas.

Nuestros resultados muestran que el 21,53% de los animales desarrollaron recidivas y/o metástasis (4,61% recidivas, 9,23% metástasis y 7,69% recidivas y metástasis) y el 20% de los animales murieron a consecuencia del CMC. Otros estudios prospectivos han dado resultados similares, pudiéndose observar una muerte asociada al cáncer en los 2 años posteriores al diagnóstico del 23,33%

(Italia, 2002)(*Sarli y col.*, 2002), 26,66% (Italia, 2010)(*Sassi y col.*, 2010), 35,57% (Suecia, 1993)(*Hellmen y col.*, 1993), 40,74% (Portugal, 2010)(*Queiroga y col.*, 2010) y 44,44% (España, 1998)(*Peña y col.*, 1998).

El tamaño tumoral (<1 , $1-2,9 \geq 3$ cm; $p = 0,02$) y el estadio clínico ($p = 0,01$) estuvieron asociados al grado histológico de malignidad (GHM). El tamaño tumoral establecido por la OMS (*Owen, 1980*) ($T_1 < 3$ cm, $T_2 = 3-5$ cm y $T_3 > 5$ cm) no estuvo asociado al GHM de forma significativa ($p = 0,06$). Este hallazgo ya se había observado previamente en un estudio que empleó el método Nottingham para los CMC (*Karayannopoulou y col.*, 2005). Nuestros resultados mostraron que el diagnóstico histológico y el grado se asociaron de forma significativa ($p < 0,01$), al igual que en este estudio prospectivo previo que empleaba el método Nottingham (*Karayannopoulou y col.*, 2005). Esta asociación podría atribuirse, parcialmente, a la evaluación de las formaciones tubulares, que forma parte de ambos análisis histopatológicos (diagnóstico y grado). Sin embargo, según nuestro estudio los tumores que presentan el mismo patrón de formación tubular no tienen por qué recibir el mismo grado de malignidad histológica. Hubo carcinomas sólidos tumores sin formaciones tubulares que fueron clasificados como grado II y III respectivamente, resultado que es muy interesante ya que generalmente se atribuye un mal pronóstico los carcinomas sólidos (*Misdorp, 2002*). De esta manera, si se emplea este método de gradación de malignidad histológica en los carcinomas sólidos podemos separar los de alta malignidad (grado III) de los de malignidad intermedia (grado II) por lo que el pronóstico es mucho más acertado que solo con el diagnóstico histopatológico. En el estudio retrospectivo de Rasotto y col (2012) también se identificaron carcinomas sólidos de grado II y de grado III empleando este mismo sistema de gradación. Lo mismo ocurre con los comedocarcinomas: todos los comedocarcinomas de nuestro estudio ($n=3$, un nuevo tipo histológico incluido en la clasificación de Golschmidt y col.) fueron categorizados con el grado III. Sin embargo, de acuerdo a los resultados del trabajo de Rasotto y col (201)(*Rasotto y col.*, 2012), los comedocarcinomas se pudieron clasificar como de grado II o III. Otro resultado que concuerda con el obtenido en la investigación de Rasotto y col. (2012) fue la asociación estadística ($p < 0,001$) encontrada entre la metástasis en el ganglio regional en el momento del diagnóstico (confirmada en la sección teñida con

hematoxilina eosina obtenida de la muestra quirúrgica) y el grado III. En el estudio previo (*Rasotto y col., 2012*), el sistema de Peña estuvo más acertado que el sistema de Misdorp detectando metástasis en los ganglios linfáticos regionales en el momento del diagnóstico. Sin embargo, el método de gradación humano de Nottingham aplicado en CMC es menos efectivo detectando las metástasis en ganglios regionales (*Karayannopoulou y col., 2005*).

Nuestros resultados demostraron que varias variables estaban relacionadas a las variables del estudio pronóstico (puntos finales de seguimiento y tiempos de supervivencia): el grado histológico, la edad (9-11 años), el estadio clínico (IV), la variable HD3 (grupo 2) y las metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico. Algunas de esas características de los tumores o de las s pacientes (edad, estadio clínico y afectación ganglionar) se habían asociado previamente con el pronóstico en estudios univariantes o multivariantes retrospectivos o prospectivos (*Sorenmo y col., 2011*). De acuerdo con nuestros resultados, ya se había propuesto previamente en análisis univariantes que la proliferación mioepitelial tiene un valor pronóstico (*Lana y col., 2007*). Además, nuestros resultados de los análisis univariantes mostraron, por un lado, que las perras castradas desarrollaron más recidivas y/o metástasis y presentaron tiempos libres de enfermedad más cortos. También de forma univariante se demostró que los animales de raza grande morían de cáncer de forma más frecuente (ST más corto) que los animales de raza pequeña. El mejor pronóstico para las razas pequeñas se ha observado en un estudio multivariante de supervivencia (*Itoh y col., 2005*), atribuyéndose, en parte, a que las perras de raza pequeña tienen tumores de menor malignidad. Sin embargo, en nuestro estudio el tipo histológico, el grado y otras características de malignidad no se asociaron de forma significativa al tamaño de raza. La posible explicación para la mayor supervivencia de las razas pequeñas podría no depender de la enfermedad neoplásica en sí, sino estar relacionado con que que estos animales presentan en general una mayor esperanza de vida en comparación con los perros de raza grande (*Greer y col., 2007*).

En estudios retrospectivos multivariantes (*Chang y col., 2005*) (*Philibert y col., 2003*) se han propuesto las categorías de tamaño tumoral según la OMS

(Owen, 1980) como un indicador pronóstico. Se ha comprobado que los tumores de más de 3 cm (estudio univariante) (Philibert y col., 2003) y los mayores de 5 cm (estudio multivariante) (Chang y col., 2005) están asociados a tasas de supervivencia menores. Sin embargo, en nuestro estudio, cuando se aplicó este criterio de clasificación de la OMS, la mayoría de las neoplasias se clasificaron como T₁ (n = 45) y T₂ (n = 15) y sólo 5 neoplasias se clasificaron como T₃. Las categorías de la OMS se asociaron a la muerte como consecuencia del cáncer y a la ST. La otra categoría de tamaño tumoral que empleamos en nuestro estudio y que subdivide los T₁ se asoció a la ST. Si combinamos los resultados del estudio univariante en cuanto al tamaño según ambos métodos de clasificación, podríamos proponer una subdivisión del estadio clínico I (T₁N₀M₀) en estadio IA (<1cm) y estadio IB (1-3cm) para afinar el pronóstico. Aunque nuestro estudio no se puede comparar por diferir en la metodología empleada, este hallazgo se ve reforzado por los resultados obtenidos por Sorensen y col. (2011), que detectaron que de 97 tumores mamarios menores de 1 cm, sólo 1 era maligno.

Finalmente, el estudio multivariante realizado en nuestro estudio seleccionó el estadio clínico y el grado histológico como las 2 variables independientes pronósticas (covariables) para las variables dependientes (TLE y ST), junto con el estadio reproductivo del animal (entera/castrada) como covariable del TLE. La transición del estadio clínico I al IV tuvo valor pronóstico en el análisis multivariante del TLE y la ST. El cambio de grado histológico I al III se consideró pronóstico en el análisis multivariante del TLE y la ST. Según la revisión realizada, esta es la primera vez que se identifican el estadio reproductivo y el sistema de gradación histológica empleado en esta investigación como factores pronóstico en un estudio prospectivo. En un estudio retrospectivo multivariante de 79 perros (Chang y col., 2005), el hecho de que las perras estuvieran castradas cuando desarrollaron el cáncer mamario también se asoció de forma significativa a una baja supervivencia después de la cirugía (seguimiento de 2 años). Los resultados en lo que respecta a las diferencias de pronóstico entre hembras enteras y castradas con CMC podrían ser atribuidas a la menor presencia de REα en las neoplasias mamarias malignas de las hembras castradas (Nieto y col., 2000). De acuerdo con estos resultados, los estudios comparativos sobre CMC que se realicen en distintos países deberían tener en cuenta la proporción de hembras

castradas en la población objeto de estudio ya que podría haber diferencias en el pronóstico. La relación entre la ovariectomía en el momento de la mastectomía del CMC y el pronóstico no se ha analizado en esta investigación.

Como consideración final nos gustaría resaltar que el sistema de gradación histológica no puede sustituir al diagnóstico histológico, sino que lo complementa. El diagnóstico histológico según Goldschmidt y col (2011) ha tenido valor pronóstico en análisis univariante a pesar de los pocos casos incluidos en cada subtipo tumoral. Para la validación del diagnóstico histológico como indicador pronóstico independiente en un análisis multivariante, se necesitaría recoger un gran número de casos de forma prospectiva a lo largo de varios años. En algunos de los tipos más infrecuentes sin pronóstico conocido, sería estadísticamente aceptable agrupar diferentes subtipos según su grado para determinar su valor pronóstico. Finalmente, es importante recordar que la variabilidad histológica del CMC puede reflejar diferentes mecanismos oncogénicos, y por lo tanto sugerir que puedan existir en el futuro diversas aproximaciones terapéuticas para los distintos subtipos histológicos.

El propósito de los estudios pronóstico es identificar marcadores que estén asociados de forma significativa e independiente al desenlace clínico, para poder aplicarlos en un paciente con un conjunto de estos marcadores. De acuerdo con nuestros resultados, esta modificación de método de gradación de Elston y Ellis adaptado al CMC es una herramienta útil para predecir el pronóstico, facilita la interpretación clínica de diagnósticos histológicos complicados y ofrece a los patólogos criterios uniformes para la determinación del grado en áreas de proliferación mioepitelial y en los tumores mixtos.

2. COMPARACIÓN DEL CÁNCER MAMARIO CANINO Y EL HUMANO DESDE UN PUNTO DE VISTA HORMONAL

Como ya hemos comentado con anterioridad, el CMC ha sido propuesto en numerosas ocasiones como un modelo natural y espontáneo para el CMH, siendo de especial utilidad en estudios que buscan nuevos enfoques terapéuticos (MacEwen, 1990, Vail y MacEwen, 2000, Peña y col., 2003a, Antuofermo y col.,

2007, Uva y col., 2009, Rasotto y col., 2014); sin embargo, algunas diferencias entre los tumores de ambas especies deben tenerse en consideración para hacer comparaciones válidas. La mayoría de los estudios previos que indican al perro como un modelo animal para el estudio del CMH no ha realizado una comparación apropiada utilizando muestras de ambas especies para verificar las similitudes entre ambos tipos de cánceres mamarios y empleando la misma metodología. Una excepción que cabe destacar es el estudio de Uva y col. (2009) que analizó la expresión génica del CMC y CMH y de muestras mamarias normales de ambas especies encontrando un gran nivel de similitud en la perturbación de varias vías relacionadas con el cáncer (Uva y col., 2009). En el presente capítulo nos propusimos conocer si el CMC y el CMH son comparables en términos de perfil hormonal, investigando la expresión de Arom y de receptores de hormonas esteroides (RE α , RE β , RP and RA), así como el contenido de hormonas esteroides (E2, SO4E1, P4, A4, DHEA and T) en una serie de tumores de ambas especies, así como estudiar las asociaciones existentes entre ellos.

De acuerdo con la literatura actual, el contenido de hormonas esteroides en CMH y CMC no se ha estudiado en profundidad, por lo tanto, esta investigación también es importante desde el punto de vista de la patogénesis hormonal del CMH y CMC en las dos especies de forma separada.

Inicialmente comenzamos realizando una comparación general entre el CMH y el CMC; sin embargo, dado que evaluábamos el estado hormonal en los tumores era necesario realizar una división del CMH en dos grupos: CMH en mujeres premenopáusicas (CMH-PM) o menopáusicas (CMH-M), ya que existen diferencias existentes en el ciclo estral en estos grupos. Si giramos de una comparación general a una más detallada de la expresión de Arom y los receptores de hormonas esteroides, comprobamos que existe una mayor cercanía entre el CMC y el CMH-PM. En lo que respecta el contenido intratumoral de hormonas esteroides, los 3 grupos mostraron incrementos similares en comparación con los tejidos de GM normal de ambas especies.

Nunca se había hecho con anterioridad una comparación entre ambas especies en cuanto a expresión inmunohistoquímica de receptores hormonales utilizando la misma metodología. Los resultados de la presente Tesis Doctoral

revelaron que la inmunoexpresión (-/+) de receptores es similar a lo descrito con anterioridad en ambas especies por separado (*Nieto y col., 2000, Selim y col., 2002, Moinfar y col., 2003, Conde y col., 2004, Martín de las Mulas y col., 2004, de Las Mulas y col., 2005, Illera y col., 2006, DeVita y col., 2008, Sorenmo y col., 2011*). En general, las muestras humanas mostraron una mayor inmunoexpresión (tanto TS como -/+) de los receptores hormonales aunque sólo de forma significativa para RE α (CMH-M), RE β (CMH-PM), RP (CMH-M) y RA (CMH-PM y CMH-M), sin embargo, los porcentajes de positividad que más se asemejaron a los de la perra fueron los del grupo de mujeres premenopáusicas.

La mayor inmunoexpresión (TS y -/+) de RE α en el grupo de mujeres menopáusicas es la diferencia más notable de nuestros resultados. En las mujeres, el RE α se asoció de forma positiva con la Arom, coincidiendo con los datos de la bibliografía (*Lykkesfeldt y col., 2009*). Más aun, en las muestras de CMH existió una asociación negativa entre el RE β y con los niveles tumorales E2 y de SO4E1, lo que parece indicar una mayor acción de los estrógenos vía RE α . En CMC, por el contrario, la poca proporción de neoplasias RE α +, el alto porcentaje de tumores RE β + (85,2% RE β + vs. 48,1% RE α + in CMC) y considerando que los niveles de E2 en los homogeneizados tumorales caninos se incrementaron con respecto a los de los controles, el E2 podría actuar mayormente vía RE β en la carcinogénesis de la glándula mamaria canina, como se ha sugerido con anterioridad (*Illera y col., 2006*). Además, en las muestras de CMC ha existido una alta frecuencia de tumores RE α -/PR+ en comparación con las muestras humanas (44,4% en CMC vs.16,6% in CMH-PM y 7,9% en CMH-M). Otro importante hallazgo de nuestros resultados que apoyaría esta hipótesis, sería que en las muestras de CMH se detectó una asociación positiva entre el RE α y el RP, como ya se ha visto con anterioridad (*Gago y col., 2006, Sarvilinna y col., 2006*), pero en la perra fue el RE β el que se asoció de forma positiva con el RP. Hay que señalar que el RE β no se ha estudiado con profundidad en el CMH (*Jarvinen y col., 2000, Mann y col., 2001, Roger y col., 2001, Skiris y col., 2001, Reese y col., 2014*) ni en el CMC (*Martín de las Mulas y col., 2004, Illera y col., 2006*), por lo tanto, el papel de este receptor debería ser investigado en futuros estudios.

A pesar de haber obtenido un resultado similar en cuanto a los porcentajes de tumores RP+ y RA+ en ambas especies, los datos obtenidos al calcular el TS indican que hay una mayor inmunoexpresión en las muestras mamarias humanas, siendo significativas para el grupo CMH-M en ambos receptores (RP, $p = 0,003$; RA, $p < 0,001$), mientras que en el grupo CMH-PM solo difiere el RA ($p = 0,001$). Pensamos que sería interesante profundizar en el futuro en este hallazgo pero también creemos que, de momento, deberíamos tener en cuenta este resultado al realizar estudios potencialmente comparativos entre el CMH y el CMC.

Por otro lado, en las muestras caninas el contenido de A4 en los tumores RA+ fue menor que en las muestras RA-, parece justificado que los niveles de A4 descendan en presencia del RA debido a la conversión de A4 a T, la cual se une a este receptor.

La formación de hormonas esteroides en los tejidos periféricos está bastante documentada en medicina humana, la enzima citocromo P450-Aromatasa (Cyp19a1) es una enzima que se ha investigado mucho en el campo del cáncer de mama en la mujer (*Esteban y col., 1992, Sasano y col., 1994, Sasano y Harada, 1998, Shenton y col., 1998, Foster, 2008, Hong y col., 2009, Lykkesfeldt y col., 2009*); desafortunadamente no ocurre lo mismo en el CMC. De acuerdo con la bibliografía consultada, un hallazgo esperado en nuestros resultados es la asociación encontrada entre la expresión de Arom y el estado menopáusico en la mujer. Esto podría guardar relación con el papel de la GM (normal o neoplásica) como una fuente periférica de estrógenos, especialmente en mujeres postmenopáusicas (*Sasano y col., 2008*).

La expresión inmunohistoquímica de Arom en las células neoplásicas fue similar en ambas especies. En el CMH la inmunoexpresión de Arom se asoció a la del RE α , como ya se ha observado en trabajos previos (*Miller y col., 1990, Lykkesfeldt y col., 2009*), mientras que la Arom se asoció con el RE β en el CMC. En el CMH, los tumores Arom+ fueron en su mayoría RE α + pero mostraron medias bajas de TS para RA, sugiriendo que cuando la enzima Arom está presente, la conversión local de T a E2 podría sobreexpresar de alguna manera al RE α , y como consecuencia, disminuir la expresión del RA. De una manera semejante, en CMC, los tumores Arom+ también fueron ER+, pero en este caso a

la isoforma β , apoyando una vez más el papel fundamental que se ha postulado para el RE β en la carcinogénesis mamaria de la especie canina (*Illera y col., 2006*). Además en la especie canina la Arom no se asoció de forma inversa al RA, pero sí se asoció al RP de la siguiente manera: la mayoría de los tumores Arom+ fueron RP+. Por lo tanto, parece existir una importante diferencia entre ambas especies en lo que respecta a la influencia de los progestágenos y los estrógenos en la carcinogénesis mamaria; esta diferencia podría estar en relación a un mayor influjo de progestágenos en la hembra canina que presenta de forma característica largos periodos de baja influencia estrogénica entre ciclos estrales. La gran influencia de los progestágenos en la GM de la especie canina ya se ha sugerido con anterioridad (*Mol y col., 1997, Lantinga-van Leeuwen y col., 2000, Guil-Luna y col., 2011*).

En lo que respecta a los niveles tisulares de hormonas esteroides, tanto los CMH como los CMC contenían cantidades más elevadas de todas las hormonas medidas con respecto a los controles de GM normal de cada especie. Estos resultados concuerdan con lo ya publicado en CMH (*Perel y col., 1982, Sasano y Harada, 1998, Yue y col., 1999, Liao y Dickson, 2002*) y CMC (*Peña y col., 2003b, Illera y col., 2006*). Sin embargo, cuando comparamos las concentraciones hormonales entre ambas especies (Tabla 2 del Anexo II) es evidente que la concentración de estrógenos (E2 y SO4E1) y de P4 son mucho mayores en los CMH que en los CMC, mientras que las concentraciones de andrógenos (A4, DHEA, T) en ambas especies son bastantes similares. Otro resultado de la presente Tesis Doctoral que requiere atención es la diferencia encontrada al comparar los niveles de T en las muestras de CMC respecto a los controles de mama normal (44 veces superior). Considerando que hubo una diferencia de casi 2 puntos menor en el TS de RA en la perra con respecto a la mujer, el papel de la T en la carcinogénesis mamaria canina es oscuro y necesita estudios en profundidad. En las muestras de CMH la mayor elevación hormonal con respecto a la GM sana se observó en la A4, tanto en el grupo de mujeres premenopáusicas como en el de menopáusicas (entre 12-16 veces superior).

Para resumir los resultados de este capítulo, la inmunotinción de Arom fue similar en ambas especies. Existieron diferencias entre los receptores de

hormonas esteroides en las neoplasias mamarias, ya que la expresión de RE α fue mucho mayor en los tumores de la especie humana. Aunque la expresión del RE β fue similar en los tres grupos estudiados, parece tener mucha mayor importancia en la especie canina, donde las neoplasias son en su mayoría RE α -. El porcentaje de tumores RP+ y RA+ fue similar también en los tres grupos estudiados, pero el TS fue inferior en la especie canina. Los niveles de estrógenos, P4 y andrógenos en las neoplasias tanto humanas como caninas se vieron incrementadas con sus respectivos controles, pero se encontraron diferentes asociaciones entre las hormonas entre sí y las hormonas y la expresión de los receptores hormonales y Arom, indicando posibles mecanismos de patogenicidad distintos en ambas especies. Los niveles intratumorales de estrógenos y progesterona fueron mucho mayores en la especie humana, sin embargo, los niveles de andrógenos entre ambas especies sí son comparables. Se necesitarían más estudios que puedan clarificar la producción y el metabolismo de las hormonas esteroides en CMC y CMH que expliquen el papel de estas hormonas de una forma comparativa para poder asegurar el empleo de la especie canina como un buen modelo natural espontáneo desde un punto de vista hormonal para el estudio de esta enfermedad en la mujer.

3. CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER MAMARIO INFLAMATORIO CANINO

Los Capítulos III y IV estudian con mayor profundidad el CIC, porque a pesar de su carácter inusualmente agresivo y de su fenotipo metastásico, no se conoce en profundidad la etiología y los mecanismos implicados en el desarrollo del CIH/CIC. Sin embargo, entre los mecanismos diferenciales que parecen estar implicados tanto en el CIH (*van Golen y col., 2000a, Shirakawa y col., 2001, Bieche y col., 2004, Charafe-Jauffret y col., 2008*) como en el CIC (*Sanchez-Archidona y col., 2007*) se han descrito varios genes que están específicamente sobreexpresados y vías moleculares señalizadoras. La angiogénesis exacerbada tan característica, la linfangiogénesis y el fenómeno de mimetismo vascular se han descrito previamente en ambas especies humana (*Shirakawa y col., 2001, Shirakawa y col., 2003*) y canina (*Peña y col., 2003a, Clemente y col., 2013*).

Además, en la especie canina, se ha postulado la existencia de un mecanismo endocrino diferente con una producción local exacerbada de hormonas esteroideas, incluyendo estrógenos y andrógenos (*Peña y col., 2003b, Illera y col., 2006*). Por ello, el Capítulo III propuso como objetivo estudiar la expresión inmunohistoquímica de aromatasa y diversos receptores hormonales [RE α , RE β , RP y RA] en muestras de CMC (CMC no CI y CIC), analizando las posibles diferencias específicas en la patogénesis del fenotipo inflamatorio

3.1. Aromatasa y receptores hormonales en el CIC. La enzima aromatasa como una potencial diana de tratamiento.

Los resultados del Capítulo III revelaron una mayor expresión inmunohistoquímica de Arom en el grupo de CIC en comparación con los CMC no CI de grado III incluidos en el estudio. Este es el primer estudio acerca de la expresión inmunohistoquímica de Arom en el CMC y particularmente, en el CIC. Este estudio también debería considerarse de relevancia para medicina humana, ya que no hay trabajos previos acerca de la expresión inmunohistoquímica de Arom en CIH.

Aunque no existen publicaciones previas de la expresión inmunohistoquímica de Arom en los CMC, sí que se ha detectado una mayor expresión de ARNm de Arom (RT-PCR) en TMC espontáneos (8 malignos y 1 benigno) respecto a hiperplasias inducidas con progestágenos de forma experimental ($n = 6$) y un incremento en ambos grupos con respecto a la mama normal ($n = 5$) (*Marinelli y col., 2004*). En un estudio previo de nuestro grupo, se observó una mayor expresión de ARNm de Arom por RT-PCR en muestras de CIC respecto a CMC no CI de todos los GHM y muestras de tejido mamario normal, aunque esta elevación no alcanzó significación estadística (*Sanchez-Archidona y col., 2007*). La técnica de RT-PCR tiene una limitación, y es que no permite la selección de células que se incluyen en el análisis, a diferencia de la técnica inmunohistoquímica que se ha empleado en el presente estudio y que permite una clara visualización de las células con expresión de Arom. Si además tenemos en cuenta la heterogeneidad de los TMC, damos mayor validez a

nuestra técnica, puesto que en los otros estudios se podrían haber incluido zonas no neoplásicas (como por ejemplo zonas del estroma o tejido hiperplásico adyacente al tumor) que resta valor al análisis. En el presente estudio sólo se ha evaluado la expresión de Arom en las células neoplásicas.

En este capítulo se ha estudiado además la expresión IHQ de los receptores de hormonas esteroides en CIC y en CMC no CI comparables (de grado de malignidad histológica III), para intentar averiguar un posible perfil diferenciador de receptores hormonales entre ambos grupos y su relación con la inmunoexpresión de Arom. Las medias de expresión del RE β y del RP fueron mayores ($p = 0.038$ y $p = 0.037$, respectivamente) en las muestras de CIC respecto a los CMC no CI. Otros estudios previos han indicado una mayor inmunoexpresión de RA y de RE β en CIC en comparación con CMC no CI de diversos grados de malignidad (*Illera y col., 2006, Sanchez-Archidona y col., 2007*). En nuestro estudio, la media del RA en el grupo CIC fue más elevada que la del grupo CMC no CI, sin embargo, esta diferencia no alcanzó significación estadística ($p = 0.201$). Esta discrepancia en el resultado se podría atribuir al hecho de que se ha realizado una selección diferente de casos de CMC no CI, ya que sólo hemos incluido casos de alta malignidad histológica (grado III) y en los previos se incluían CMC no CI de grados I, II y III para la comparación con el grupo CIC. Nuestra selección de casos se considera mucho más acertada ya que sólo se compararon casos de semejante malignidad histológica (grado III).

Otro resultado de relevancia es la baja expresión del RE α en los casos de CIC. Este dato es semejante a lo publicado previamente (*Illera y col., 2006*). La mayoría de los CIC (85,7%) fueron negativos al RE α . Además, el RE α se expresó menos en el grupo CIC en comparación con el grupo CMC no CI, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística. En el CIH, la falta de expresión del RE α es uno de los 5 parámetros que pertenecen a la firma inmunofenotípica del CIH (*Hahnel y col., 1971, Charafe-Jauffret y col., 2008*). La baja presencia del RE α tanto en CIC como en CIH refuerza la semejanza de la enfermedad entre ambas especies.

Por el contrario, la expresión del RE β en ambos grupos (CIC y CMC no CI) fue muy elevada (en términos de TS), lo que sugiere una mayor participación del

RE β que del RE α en el CMC, como ya se ha sugerido en el Capítulo II. A pesar de los pocos estudios publicados acerca de la expresión inmunohistoquímica del RE β en el CMC (*de Las Mulas y col., 2005, Illera y col., 2006, Port Louis y col., 2012*), nuestros resultados apoyan una vez más nuestra hipótesis previa de un papel esencial del RE β no solo en el CMC, sino además, en el fenotipo inflamatorio (*Illera y col., 2006*). Este resultado apoyaría la hipótesis de que los estrógenos actúan vía RE β en la especie canina, como ya se sugirió con anterioridad (*Peña y col., 2003a, Illera y col., 2006*).

Se encontró una asociación inversa entre la expresión de Arom (TS y -/+) y del RP (-/+) en el grupo CMC no CI ($p = 0,007$ y $p = 0,047$, respectivamente). En el grupo CIC, la asociación entre la expresión de Arom (-/+) y el RE α (TS) fue casi significativa ($p = 0.083$). Sólo los tumores Arom+ expresaron el RE α . En estudios de medicina humana de CMH, cuando la expresión de Arom se compara con la expresión de RE α y de PR los resultados son controvertidos. Existen algunos estudios que describen una correlación inversa entre la inmunoreactividad de Arom y el RE α (*Esteban y col., 1992*); sin embargo otros indican justamente lo contrario (*Lykkesfeldt y col., 2009*). Con respecto al RP, varios estudios aseguran que no se da una asociación significativa entre la expresión inmunohistoquímica de Arom y de RP en CMH (*Esteban y col., 1992, Lykkesfeldt y col., 2009*). La asociación inversa entre Arom y RP encontrado en nuestros CMC no CI requiere una investigación en profundidad, ya que la perra se encuentra bajo una exposición prolongada a los progestágenos durante el largo periodo de anestro, y además, los TMC expresan frecuentemente el RP (*Millanta y col., 2005, Millanta y col., 2009*).

El tratamiento de las dos líneas celulares de CI IPC-366 y SUM-149 con el inhibidor de aromatasa letrozole produjo una fuerte inhibición del crecimiento celular con todas las dosis empleadas. Se necesitan más estudios para aclarar el posible mecanismo de acción de letrozole en estas líneas celulares, como por ejemplo, el papel de RE β . Cabe resaltar que ambas líneas son negativas al RE α y al RP, y la terapia con inhibidores de Arom sólo está indicada en mujeres que padecen cáncer de mama hormono dependiente. Sin embargo, se ha visto que los estrógenos pueden estimular el crecimiento de células de cáncer de mama triple

negativas (RE-, PR-, HER2-) en la ausencia del RE α , a través de un RE que reside en la membrana plasmática (*Razandi y col., 2002*). Este receptor se denomina *G-protein coupled receptor*, GPR30 (*Filardo y col., 2000, Revankar y col., 2005*), y todavía se está investigando su papel como una molécula diana en las terapias antitumorales (*Girgert y col., 2012, 2014*). En futuros estudios se podrá demostrar si los inhibidores de Arom podrían ser de interés potencial en el tratamiento de determinados subtipos de cáncer de mama triple negativos, incluyendo el CI.

La terapia antiestrogénica con tamoxifeno no se emplea de forma rutinaria en perras con CMC debido a los efectos adversos tan severos que se presentan (*Morris y col., 1993*). Sin embargo, en un estudio piloto, se ha demostrado que los antagonistas de los RP mifepristone y aglepristone inhibieron el crecimiento de los TMC (*Guil-Luna y col., 2011*). En el CMH, se ha correlacionado la actividad intratumoral de Arom con la respuesta al tratamiento con inhibidores de Arom (*Miller y col., 2003*).

Por lo tanto, la sobreexpresión de Arom que se ha detectado en nuestros casos apoyaría la realización de estudios futuros para el tratamiento de perras con CIC, puesto que parece que el RE β pudiera tener la mayor importancia en CIC.

Por otro lado, se ha visto que los estrógenos pueden estimular el crecimiento de las células de CMH triple negativas (RE α -, RP- y HER2-), ya que en la ausencia del RE α , los estrógenos actúan a nivel celular a través de un RE que reside en la membrana plasmática (*Razandi y col., 2002*). Este receptor ha sido denominado *G-protein coupled receptor* (GPR30) (*Filardo y col., 2000, Revankar y col., 2005*), y en la actualidad se encuentra en estudio su valor como diana para terapia anticancerosa (*Girgert y col., 2012, 2014*). Sería necesaria la realización de estudios *in vitro* e *in vivo* para valorar el posible uso de inhibidores de Arom en CMC RE+ y RE- como una alternativa apropiada a la terapia anti hormonal en la especie canina, dada su baja toxicidad.

3.2. Elevación de niveles de IL-8 e IL-10

Además de un panel de expresión inmunohistoquímica de receptores hormonales diferente en el CIC, hemos investigado en la perra otros mecanismos que, según se ha publicado, parecen estar específicamente implicados en el desarrollo del fenotipo “inflamatorio” del CIH, como son la producción o de expresión de varias ILs (IL-1 β , IL-6 e IL-8) (*Van Golen y col., 2000b, Shirakawa y col., 2001, Bieche y col., 2004*). Por ello, para obtener un mayor conocimiento de la patogénesis del CIC, el propósito del Capítulo IV fue analizar por primera vez los niveles de una serie de citoquinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10) en homogeneizados tumorales y suero de 41 perros con TMBH, CMC no CI y CIC. Los niveles de IL-8 (suero) y de IL-10 (suero y homogeneizado tumoral) estuvieron significativamente más elevados en el grupo de CIC que en el grupo de CMC no CI. Aunque algunas ILs también se incrementan en procesos inflamatorios, las diferencias halladas en este estudio entre los CIC y los CMC no CI no deben atribuirse a una mayor inflamación a nivel local, ya que no se observan diferencias en los infiltrados inflamatorios entre muestras CMC no CI y CIC (*Peña y col., 2003a*).

En los homogeneizados tumorales sólo se observó una elevación significativa en los niveles de IL-10 en el grupo CIC en comparación con el CMC no CI. Los niveles de IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 fueron similares en ambos grupos. En el CIH, hay un estudio que obtuvo resultados semejantes al comparar niveles de IL-1 α , IL-1 β e IL-8 en muestras de CIH y muestras de CMH no CI (*Bieche y col., 2004*).

Según la revisión bibliográfica realizada, ésta es la primera investigación que mide niveles de IL-10 en TMC. Los niveles tisulares de IL-10 elevados encontrados en las muestras de CIC parecen indicar una importante participación de esta interleucina en la patogénesis del CIC. La IL-10 es primariamente una citoquina antiinflamatoria muy potente que inhibe la expresión génica y la síntesis de citoquinas por parte de las células T/macrófagos e inhibe su capacidad para presentar antígenos, por lo tanto, suprime la producción de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 por parte de células inflamatorias (*Moore y col., 1993*). Estos niveles elevados de IL-10 podrían explicar los datos publicados previamente que

aseguran que no hay diferencias en cuanto al infiltrado inflamatorio entre muestras de CMC no CI y muestras CIC, ya que el infiltrado inflamatorio se incrementa con la malignidad en los TMC y el CIC es el tipo de TMC con mayor malignidad (*Peña y col., 2003a*). Por el contrario, algunas de las diferencias encontradas en los niveles de ILs del presente estudio al comparar los niveles de la GM normal con los TMC y entre los TMBH y los CMC se podrían atribuir parcialmente a una mayor inflamación asociada al tumor.

Los niveles séricos de IL-10 en perros con CIC también estuvieron incrementados de forma significativa, este hallazgo también se ha descrito en mujeres con CMH metastático (*Merendino y col., 1996*) y este resultado podría deberse a que excepto uno, todos los casos de CIC incluidos en el estudio presentaban metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

La producción de IL-10 se ha relacionado con la infección crónica del *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV) (*Papiernik y col., 1997*), el cual tiene una homología del 85% al 95% con el virus humano *Human Mammary Tumor Virus* (HMTV) (*Pogo y col., 2010*). Es interesante remarcar que la posible etiología viral del CIH y sus implicaciones en la epidemiología es un tema que ha generado gran interés recientemente y se encuentra en investigación. Estudios previos han postulado una posible participación del HMTV (*Levine y col., 1984, Pogo y col., 2010*) o del MMTV (*Arias-Pulido, 2012, Levine y col., 2012*) en la etiopatogénesis del CIH. Sería muy interesante investigar con mayor profundidad la detección de partículas virales en muestras de CIC y su relación con los niveles de IL-10 para poder clarificar este interesante resultado.

Otro resultado digno de mención es la elevación de los niveles séricos de IL-8 en el grupo CIC con respecto a los otros. Un estudio previo realizado en un xenotransplante de ratón de CIH de forma experimental (*Shirakawa y col., 2001*) detectó niveles elevados de IL-8 humana en el suero de los ratones xenotransplantados en comparación con el suero de ratones con un xenotransplante no inflamatorio. Además, también se han detectado altos niveles de IL-8 en el medio de cultivo de la línea celular SUM-149, lo que sugiere la producción de esta IL por parte de las células de CIH (*Van Golen y col., 2000b*). Nuestros resultados en suero canino confirman la participación de IL-8 también el

CIC espontáneo. Estos niveles elevados de IL-8 podrían estar asociados a la angiogénesis exacerbada que es característica de este tipo de cáncer mamario tanto en la mujer como en la perra, ya que se considera que la IL-8 es un estimulante de la angiogénesis (*Zlotnik y Yoshie, 2000, Lin y col., 2004*). Los niveles de IL-8 en suero también se han asociado de manera significativa con peor pronóstico y metástasis en CMH (*Benoy y col., 2004, Derin y col., 2007*), de manera que también podría ser una explicación válida para nuestros resultados, ya que la mayoría de nuestros casos CIC eran metastásicos; también podría explicar la elevación sérica de IL-8 en el grupo de CMC no CI con respecto los TMBH y los controles. El aumento de la IL-8 en TMC con malignidad clínica se ha publicado previamente (*Gelaleti y col., 2012*), y se ha propuesto la IL-8 como un marcador sérico de pronóstico para la progresión de la enfermedad y la aparición de recidivas. Sin embargo, ese mismo grupo de investigación había indicado previamente que la IL-8 en el tejido disminuía en los CMC respecto a la GM normal (detectada por inmunohistoquímica y PCR), estando la expresión de IL-8 asociada a supervivencias más largas y sugiriendo un papel protector de la progresión tumoral para la IL-8 en los tejidos (*Zuccari y col., 2011*).

Por el contrario, nuestros resultados revelaron que la IL-8 en el tejido se eleva con la malignidad (ver tabla 2 del Anexo IV), al igual que ocurría con los niveles séricos, aunque las diferencias encontradas en los tejidos no fueron estadísticamente significativas. Esta falta de significación estadística en los niveles tisulares de IL-8 en los CIC versus CMC no CI se debe probablemente al reducido número de casos incluido en este estudio; este aspecto es muy importante y requiere una investigación con un mayor número de casos y una valoración inmunohistoquímica. Por otro lado, nuestros resultados no pueden ser totalmente comparados con los de Zuccari y col. (2011) puesto que nosotros solo incluimos CMC no CI de grado III, mientras que ellos analizaron 5 tumores mamarios benignos, CMC de grado I y II y sólo un tumor maligno grado III.

Los niveles de IL-6 en los homogeneizados tumorales fueron más elevados en los tumores malignos (CMC no CI y CIC) en comparación con TMBH. Este resultado es similar a lo publicado con anterioridad, puesto que un estudio que comparó la expresión inmunohistoquímica de IL-6 en TMC benignos y malignos,

encontró niveles más elevados de expresión en los CMC asociado a la existencia de metástasis (*Kim y col., 2010*), aunque en nuestro estudio no se encontró relación con las metástasis. Teniendo en cuenta que las células neoplásicas pueden producir IL-6 como un factor de crecimiento autocrino (*Angelo y Kurzrock, 2007*), nuestros resultados confirman que la IL-6 también se asocia a la malignidad tumoral en los CMC y podría tener un papel crítico en el crecimiento tumoral.

Los resultados de esta investigación son un poco limitados por el relativo bajo número de casos incluidos en el estudio, especialmente, de casos de CIC. Como ya se ha mencionado con anterioridad, dada la baja prevalencia del CIC normalmente se estudia en estudios retrospectivos, en el diseño experimental se determinó que sería un estudio prospectivo, y por lo tanto, no se obtuvieron muchos casos de CIC. Sin embargo, a pesar del bajo número de casos CIC, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en el grupo CI, y pueden ser consideradas como resultados preliminares robustos, que podrían indicar diferencias en el mecanismo de patogenicidad del CIC, lo que podría ser de gran utilidad en cuanto al diagnóstico de la enfermedad o para el posible desarrollo de nuevas terapias. Además, estos resultados son concordantes con lo publicado para el CIH, por lo que nos ayudan a apoyar la validez del modelo canino para el estudio del CIH.

Los hallazgos presentados en esta Tesis Doctoral abren nuevas incógnitas y proponen nuevas vías de investigación necesarias para continuar con el estudio del potencial uso del modelo natural canino para el estudio del cáncer mamario en la especie humana y además, clarifica de alguna forma la patogénesis del cáncer mamario inflamatorio, con la esperanza de que la especie canina sea de utilidad en el estudio de futuros tratamientos de este tipo de cáncer en la mujer y en la perra.

CONCLUSIONES

X. CONCLUSIONES

1. El método de gradación histológica adaptado al CMC es un factor pronóstico independiente y, por lo tanto, es una herramienta útil para predecir el pronóstico, facilita la interpretación clínica de diagnósticos histológicos complicados y ofrece a los patólogos criterios uniformes para la determinación del grado en áreas de proliferación mioepitelial y en los tumores mixtos.
2. Junto con el grado histológico, el estadio clínico avanzado y la castración son factores pronóstico independientes negativos para la supervivencia de los animales. Por su repercusión en el pronóstico, proponemos una subdivisión del estadio clínico I (T1N0M0) en estadio IA (<1cm) y estadio IB (1-3cm).
3. Los estudios comparativos sobre CMC que se realicen en distintos países deberían tener en cuenta la proporción de hembras castradas en la población objeto de estudio ya que podría haber diferencias en el pronóstico.
4. Aunque se ha propuesto el CMC como modelo de estudio del CMH, existen similitudes y diferencias hormonales entre ambos que deberían tenerse en cuenta en estudios comparativos.
5. Ambas especies presentan incrementos intratumorales en todas las hormonas esteroideas analizadas y similar expresión de Arom. Sin embargo, el CMC tiene menos porcentaje de tumores positivos al RE α y diferentes asociaciones de algunos receptores que parecen indicar un papel más preponderante del RE β .

6. El CIC presenta características diferenciales de expresión de la enzima Arom y de receptores de hormonas esteroideas respecto a otras neoplasias mamarias malignas comparables de elevado grado de malignidad, lo que apoya la hipótesis emitida previamente de la existencia de un mecanismo endocrino diferente en este tipo especial de cáncer mamario.
7. La sobreexpresión inmunohistoquímica de Arom encontrada en el CIC y la disminución de proliferación de dos líneas celulares triple negativas de CIC (IPC-366) y de CIH (SUM-149) al ser tratadas con una droga anti-Arom (letrozole), indican que la Arom podría ser una posible molécula diana a investigar para en el tratamiento de este tipo de cáncer.
8. Las ILs IL-6, IL-8 e IL-10 tienen un papel de relevancia en la malignidad de los TMC. Las diferencias encontradas en el CIC apuntan hacia mecanismos específicos en este tipo de neoplasia que podrían tener implicaciones terapéuticas y de diagnóstico.
9. Las variaciones en el contenido de ILs encontradas en el CIC, semejantes a las descritas en el CIH, apoyan la validez de este modelo natural para el estudio comparativo con la especie humana.

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAM, G. E. (1974). Ovarian and adrenal contribution to peripheral androgens during the menstrual cycle. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 39, 340-346.
- ALPAUGH, M. L., TOMLINSON, J. S., SHAO, Z. M. & BARSKY, S. H. (1999). A novel human xenograft model of inflammatory breast cancer. *Cancer Res* 59, 5079-5084.
- ALLRED, D. C., HARVEY, J. M., BERARDO, M. & CLARK, G. M. (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 11, 155-168.
- ALLRED, D. C. & MEDINA, D. (2008). The relevance of mouse models to understanding the development and progression of human breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 13, 279-288.
- AMADO, J. & FLÓREZ, J. (2003). Hormonas sexuales: estrogenos, gestagenos, androgenos y anticonceptivos hormonales. *Farmacologia humana*. Masson. Barcelona: 887-912.
- ANDERSON, W. F., CHU, K. C. & CHANG, S. (2003). Inflammatory breast carcinoma and noninflammatory locally advanced breast carcinoma: distinct clinicopathologic entities? *J Clin Oncol* 21, 2254-2259.
- ANDERSON, W. F., SCHAIRER, C., CHEN, B. E., HANCE, K. W. & LEVINE, P. H. (2005). Epidemiology of inflammatory breast cancer (IBC). *Breast Dis* 22, 9-23.
- ANGELO, L. S. & KURZROCK, R. (2007). Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin Cancer Res* 13, 2825-2830.
- ANTUOFERMO, E., MILLER, M. A., PIRINO, S., XIE, J., BADVE, S. & MOHAMMED, S. I. (2007). Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs--a model of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 2247-2256.
- APTE, R. N., DOTAN, S., ELKABETS, M., WHITE, M. R., REICH, E., CARMI, Y., SONG, X., DVOZKIN, T., KRELIN, Y. & VORONOV, E. (2006). The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev* 25, 387-408.
- ARIAS-PULIDO, H. (2012). Incidence of mouse mammary tumor virus-like variant sequences in inflammatory breast cancer. *Third International Inflammatory Breast Cancer Conference* Philadelphia, USA.
- ARIHIRO, K., ODA, H., KANEKO, M. & INAI, K. (2000). Cytokines facilitate chemotactic motility of breast carcinoma cells. *Breast Cancer* 7, 221-230.
- ASGEIRSSON, K. S., OLAFSDOTTIR, K., JONASSON, J. G. & OGMUNDSDOTTIR, H. M. (1998). The effects of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer. *Cytokine* 10, 720-728.
- AZIZ, S. A., PERVEZ, S., KHAN, S., KAYANI, N., AZAM, S. I. & RAHBAR, M. H. (2001). Case control study of prognostic markers and disease outcome in inflammatory carcinoma breast: a unique clinical experience. *Breast J* 7, 398-404.

BELVEDERE, P., GABAI, G., DALLA VALLE, L., ACCORSI, P., TRIVOLETTI, M., COLOMBO, L. & BONO, G. (1996). Occurrence of steroidogenic enzymes in the bovine mammary gland at different functional stages. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59, 339-347.

BELLINO, F. L. & WISE, P. M. (2003). Nonhuman primate models of menopause workshop. *Biol Reprod* 68, 10-18.

BENJAMIN, S. A., LEE, A. C. & SAUNDERS, W. J. (1999). Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Veterinary Pathology* 36, 423-436.

BENOY, I. H., SALGADO, R., VAN DAM, P., GEBOERS, K., VAN MARCK, E., SCHARPE, S., VERMEULEN, P. B. & DIRIX, L. Y. (2004). Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res* 10, 7157-7162.

BERG, J. W. & HUTTER, R. V. (1995). Breast cancer. *Cancer* 75, 257-269.

BERNSTEIN, L. & ROSS, R. K. (1993). Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15, 48-65.

BIECHE, I., LEREBOURS, F., TOZLU, S., ESPIE, M., MARTY, M. & LIDEREAU, R. (2004). Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. *Clin Cancer Res* 10, 6789-6795.

BIRRELL, S. N., BENTEL, J. M., HICKEY, T. E., RICCIARDELLI, C., WEGER, M. A., HORSFALL, D. J. & TILLEY, W. D. (1995). Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52, 459-467.

BLANKENSTEIN, M. A., VAN DE VEN, J., MAITIMU-SMEELE, I., DONKER, G. H., DE JONG, P. C., DAROSZEWSKI, J., SZYMCAK, J., MILEWICZ, A. & THIJSEN, J. H. (1999). Intratumoral levels of estrogens in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 293-297.

BLOOM, H. J. (1950a). Further studies on prognosis of breast carcinoma. *Br J Cancer* 4, 347-367.

BLOOM, H. J. (1950b). Prognosis in carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 4, 259-288.

BLOOM, H. J. & RICHARDSON, W. W. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11, 359-377.

BOCCUZZI, G., BRIGNARDELLO, E., DI MONACO, M., GATTO, V., LEONARDI, L., PIZZINI, A. & GALLO, M. (1994). 5-En-androstene-3 beta,17 beta-diol inhibits the growth of MCF-7 breast cancer cells when oestrogen receptors are blocked by oestradiol. *Br J Cancer* 70, 1035-1039.

BONNETERRE, J., BUZDAR, A., NABHOLTZ, J. M., ROBERTSON, J. F., THURLIMANN, B., VON EULER, M., SAHMOUD, T., WEBSTER, A. & STEINBERG, M. (2001). Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy in hormone receptor positive advanced breast carcinoma. *Cancer* 92, 2247-2258.

- BONNIER, P., CHARPIN, C., LEJEUNE, C., ROMAIN, S., TUBIANA, N., BEEDASSY, B., MARTIN, P. M., SERMENT, H. & PIANA, L. (1995). Inflammatory carcinomas of the breast: a clinical, pathological, or a clinical and pathological definition? *Int J Cancer* 62, 382-385.
- BOROWSKY, A. D. (2003). Genetically engineering a mouse. *Comp Med* 53, 249-250.
- BOYLE, P. & FERLAY, J. (2005). Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 16, 481-488.
- BRODIE, A., LU, Q. & NAKAMURA, J. (1997). Aromatase in the normal breast and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61, 281-286.
- BROOKS, H. L., MANDAVA, N., PIZZI, W. F. & SHAH, S. (1998). Inflammatory breast carcinoma: a community hospital experience. *J Am Coll Surg* 186, 622-629.
- BRUEGGEMEIER, R. W., HACKETT, J. C. & DIAZ-CRUZ, E. S. (2005). Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocr Rev* 26, 331-345.
- BRYANT, T. (1889). Disease of the breast. *Wood's Medical and Surgical Monographs*. 4: 35-322.
- BURGER, H. G. (2002). Androgen production in women. *Fertil Steril* 77 Suppl 4, S3-5.
- BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R. & TIETZ, N. W. (1999). *Tietz textbook of clinical chemistry*. Philadelphia ; London, W.B. Saunders.
- CACERES, S., PENA, L., DE ANDRES, P. J., ILLERA, M. J., LOPEZ, M. S., WOODWARD, W. A., REUBEN, J. M. & ILLERA, J. C. (2015). Establishment and Characterization of a New Cell Line of Canine Inflammatory Mammary Cancer: IPC-366. *PLoS One* 10, e0122277.
- CÁCERES, S., PEÑA, L., DE ANDRÉS, P. J., ILLERA, M. J., LÓPEZ, M. S., WOODWARD, W. A., REUBEN, J. M. & ILLERA, J. C. (2015). Establishment and Characterization of a New Cell Line of Canine Inflammatory Mammary Cancer: IPC-366. *PLoS One* 10, e0122277.
- CAILLEAU, R., YOUNG, R., OLIVE, M. & REEVES, W. J., JR. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 53, 661-674.
- CAMACHO, L., PENA, L., GONZALEZ GIL, A., CACERES, S., DIEZ, L. & ILLERA, J. C. (2013). Establishment and characterization of a canine xenograft model of inflammatory mammary carcinoma. *Research in veterinary science* 95, 1068-1075.
- CARDIFF, R. D., ROSNER, A., HOGARTH, M. A., GALVEZ, J. J., BOROWSKY, A. D. & GREGG, J. P. (2004). Validation: the new challenge for pathology. *Toxicol Pathol* 32 Suppl 1, 31-39.
- CARDIFF, R. D. & WELLINGS, S. R. (1999). The comparative pathology of human and mouse mammary glands. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4, 105-122.
- CARPENTER, R. & MILLER, W. R. (2005). Role of aromatase inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* 93 Suppl 1, S1-5.

CLARKE, R. & BRUNNER, N. (1996). Acquired estrogen independence and antiestrogen resistance in breast cancer Estrogen receptor driven phenotypes? *Trends Endocrinol Metab* 7, 291-301.

CLEMENTE, M., DE ANDRES, P. J., PEÑA, L. & PÉREZ ALENZA, M. D. (2009). Survival time of dogs with Inflammatory Mammary Cancer treated with chemotherapy and palliative therapy versus palliative therapy alone. *Vet Rec* XXX, XXX.

CLEMENTE, M., PÉREZ-ALENZA, M. D., ILLERA, J. C. & PEÑA, L. (2010a). Histological, Immunohistological, and Ultrastructural Description of Vasculogenic Mimicry in Canine Mammary Cancer. *Veterinary Pathology*.

CLEMENTE, M., PEREZ-ALENZA, M. D. & PENA, L. (2010b). Metastasis of canine inflammatory versus non-inflammatory mammary tumours. *J Comp Pathol* 143, 157-163.

CLEMENTE, M., SANCHEZ-ARCHIDONA, A. R., SARDON, D., DIEZ, L., MARTIN-RUIZ, A., CACERES, S., SASSI, F., DOLORES PEREZ-ALENZA, M., ILLERA, J. C., DUNNER, S. & PENA, L. (2013). Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. *Vet J* 197, 427-432.

CLEMENTE, M., SÁNCHEZ-ARCHIDONA, A. R., SASSI, F., DE ANDRÉS, P. J., PÉREZ-ALENZA, M. D., SILVÁN, G., ILLERA, J. C., DUNNER, S. & PEÑA, L. (2008). Special features of angiogenesis in Canine Inflammatory Mammary Cancer. First International Inflammatory Breast Cancer Conference, Houston, TX.

CLEMONS, M. & GOSS, P. (2001). Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 344, 276-285.

COHEN, M., SAIDLA, J. E. & SCHLAFFER, D. H. (2001). A spontaneously occurring mammary gland ductal carcinoma in situ in a rhesus macaque (*Macaca mulatta*) and a review of spontaneous mammary gland tumors in rhesus monkeys. *J Med Primatol* 30, 121-126.

COICO, R., SUNSHINE, G. & BENJAMINI, E. (2003). *Immunology : a short course*. Hoboken, N.J. ; [Chichester], Wiley-Liss.

CONDE, I., ALFARO, J. M., FRAILE, B., RUIZ, A., PANIAGUA, R. & ARENAS, M. I. (2004). DAX-1 expression in human breast cancer: comparison with estrogen receptors ER-alpha, ER-beta and androgen receptor status. *Breast Cancer Res* 6, R140-148.

CHANG, C. Y., CHIOU, P. P., CHEN, W. J., LI, Y. H., YIU, J. C., CHENG, Y. H., CHEN, S. D., LIN, C. T. & LAI, Y. S. (2009). Assessment of the tumorigenesis and drug susceptibility of three new canine mammary tumor cell lines. *Res Vet Sci*.

CHANG, S., ALDERFER, J. R., ASMAR, L. & BUZDAR, A. U. (2000). Inflammatory breast cancer survival: the role of obesity and menopausal status at diagnosis. *Breast Cancer Res Treat* 64, 157-163.

- CHANG, S., BUZDAR, A. U. & HURSTING, S. D. (1998b). Inflammatory breast cancer and body mass index. *J Clin Oncol* 16, 3731-3735.
- CHANG, S., PARKER, S. L., PHAM, T., BUZDAR, A. U. & HURSTING, S. D. (1998a). Inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program of the National Cancer Institute, 1975-1992. *Cancer* 82, 2366-2372.
- CHANG, S. C., CHANG, C. C., CHANG, T. J. & WONG, M. L. (2005). Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227, 1625-1629.
- CHARAFE-JAUFFRET, E., TARPIN, C., VIENS, P. & BERTUCCI, F. (2008). Defining the molecular biology of inflammatory breast cancer. *Semin Oncol* 35, 41-50.
- CHARPIN, C., BONNIER, P., KHOUZAMI, A., VACHERET, H., ANDRAC, L., LAVAUT, M. N., ALLASIA, C. & PIANA, L. (1992). Inflammatory breast carcinoma: an immunohistochemical study using monoclonal anti-pHER-2/neu, pS2, cathepsin, ER and PR. *Anticancer Res* 12, 591-597.
- CHAVEY, C., BIBEAU, F., GOURGOU-BOURGADE, S., BURLINCHON, S., BOISSIERE, F., LAUNE, D., ROQUES, S. & LAZENNEC, G. (2007). Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res* 9, R15.
- CHELOUCHE-LEV, D., MILLER, C. P., TELLEZ, C., RUIZ, M., BAR-ELI, M. & PRICE, J. E. (2004). Different signalling pathways regulate VEGF and IL-8 expression in breast cancer: implications for therapy. *Eur J Cancer* 40, 2509-2518.
- CHETRITE, G. S., CORTES-PRIETO, J., PHILIPPE, J. C., WRIGHT, F. & PASQUALINI, J. R. (2000). Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 72, 23-27.
- CHIEDOZI, L. C. (1987). Rapidly progressing breast cancer in Nigeria. *Eur J Surg Oncol* 13, 505-509.
- CHLEBOWSKI, R. T., HENDRIX, S. L., LANGER, R. D., STEFANICK, M. L., GASS, M., LANE, D., and others (2003). Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 289, 3243-3253.
- D'ARVILLE, C. N., EVANS, B. A., BORTHWICK, G. & PIERREPOINT, C. G. (1980). Aspects of steroid metabolism in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch. *J Steroid Biochem* 13, 1407-1411.
- DAUVOIS, S., LI, S. M., MARTEL, C. & LABRIE, F. (1989). Inhibitory effect of androgens on DMBA-induced mammary carcinoma in the rat. *Breast Cancer Res Treat* 14, 299-306.
- DAWOOD, S., BROGLIO, K., GONZALEZ-ANGULO, A. M., KAU, S. W., ISLAM, R., HORTOBAGYI, G. N. & CRISTOFANILLI, M. (2008). Prognostic value of body mass index in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 14, 1718-1725.

BIBLIOGRAFÍA

DAWOOD, S., MERAJVER, S. D., VIENS, P., VERMEULEN, P. B., SWAIN, S. M., BUCHHOLZ, T. A., and others (2011). International expert panel on inflammatory breast cancer: consensus statement for standardized diagnosis and treatment. *Ann Oncol* 22, 515-523.

DE ANDRÉS, P. J., ILLERA, J. C., CÁCERES, S., DÍEZ, L., PÉREZ-ALENZA, M. D. & PEÑA, L. (2013). Increased levels of Interleukins 8 and 10 as findings of canine inflammatory mammary cancer. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.

DE LAS MULAS, J. M., MILLÁN, Y. & DIOS, R. (2005). A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol* 42, 200-212.

DE OLIVEIRA, J. T., PINHO, S. S., DE MATOS, A. J., HESPANHOL, V., REIS, C. A. & GARTNER, F. (2009). MUC1 expression in canine malignant mammary tumours and relationship to clinicopathological features. *Veterinary Journal* 182, 491-493.

DELARUE, J. C., MAY-LEVIN, F., MOURIESSE, H., CONTESSO, G. & SANCHO-GARNIER, H. (1981). Oestrogen and progesterone cytosolic receptors in clinically inflammatory tumours of the human breast. *Br J Cancer* 44, 911-916.

DEN OTTER, W., HACK, M., JACOBS, J. J., TAN, J. F., ROZENDAAL, L. & VAN MOORSELAAR, R. J. (2015). Treatment of transmissible venereal tumors in dogs with intratumoral interleukin-2 (IL-2). A pilot study. *Anticancer research* 35, 713-717.

DERIN, D., SOYDINC, H. O., GUNEY, N., TAS, F., CAMLICA, H., DURANYILDIZ, D., YASASEVER, V. & TOPUZ, E. (2007). Serum IL-8 and IL-12 levels in breast cancer. *Med Oncol* 24, 163-168.

DEVITA, V. T., LAWRENCE, T. S. & ROSENBERG, S. A. (2008). DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer : principles & practice of oncology. Philadelphia, Pa. ; London, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.

DEY, P., BARROS, R. P., WARNER, M., STROM, A. & GUSTAFSSON, J. A. (2013). Insight into the mechanisms of action of estrogen receptor beta in the breast, prostate, colon, and CNS. *Journal of molecular endocrinology* 51, T61-74.

DÍAZ CHICO, B. (2004). Bioquímica básica de las hormonas esteroideas: Biología y clínica del cáncer. *Biocáncer* 2.

DIMITRAKAKIS, C., ZHOU, J. & BONDY, C. A. (2002). Androgens and mammary growth and neoplasia. *Fertil Steril* 77 Suppl 4, S26-33.

DINARELLO, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-2147.

DONNAY, I., RAUIS, J. & VERSTEGEN, J. (1994). Influence des antécédents hormonaux sur l'apparition clinique des tumeurs mammaires chez la chienne. Étude épidémiologique. *Ann Med Vet* 138, 109-117.

- DORN, C. R., TAYLOR, D. O., SCHNEIDER, R., HIBBARD, H. H. & KLAUBER, M. R. (1968). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst* 40, 307-318.
- DROULIAS, C. A., SEWELL, C. W., MCSWEENEY, M. B. & POWELL, R. W. (1976). Inflammatory carcinoma of the breast: A correlation of clinical, radiologic and pathologic findings. *Ann Surg* 184, 217-222.
- DU, X. L., FOX, E. E. & LAI, D. (2008). Competing causes of death for women with breast cancer and change over time from 1975 to 2003. *Am J Clin Oncol* 31, 105-116.
- DUTRA, A. P., GRANJA, N. V., SCHMITT, F. C. & CASSALI, G. D. (2004). c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res* 37, 1673-1681.
- ELSE, R. W. & HANNANT, D. (1979). Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. *Vet Rec* 104, 296-304.
- ELSTON, C. W. & ELLIS, I. O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 403-410.
- ELLIS, D. L. & TEITELBAUM, S. L. (1974). Inflammatory carcinoma of the breast. A pathologic definition. *Cancer* 33, 1045-1047.
- ESCUDERO FERNÁNDEZ, M., Ed. (2006). *Avances en el Cáncer de Mama*. Madrid, Real Academia Nacional de Medicina.
- ESTEBAN, J. M., WARSI, Z., HANIU, M., HALL, P., SHIVELY, J. E. & CHEN, S. (1992). Detection of intratumoral aromatase in breast carcinomas. An immunohistochemical study with clinicopathologic correlation. *Am J Pathol* 140, 337-343.
- FANTOZZI, A. & CHRISTOFORI, G. (2006). Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast cancer research : BCR* 8, 212.
- FELDMAN, E. C. & NELSON, R. W. (2004). *Canine and feline endocrinology and reproduction*. St. Louis, Mo. ; [Great Britain], W.B. Saunders.
- FERNANDEZ, S. V., ROBERTSON, F. M., PEI, J., ABURTO-CHUMPITAZ, L., MU, Z., CHU, K., and others (2013). Inflammatory breast cancer (IBC): clues for targeted therapies. *Breast cancer research and treatment* 140, 23-33.
- FILARDO, E. J., QUINN, J. A., BLAND, K. I. & FRACKELTON, A. R., JR. (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular endocrinology* 14, 1649-1660.
- FOROZAN, F., VELDMAN, R., AMMERMAN, C. A., PARSA, N. Z., KALLIONIEMI, A., KALLIONIEMI, O. P. & ETHIER, S. P. (1999). Molecular cytogenetic analysis of 11 new breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 81, 1328-1334.

- FOSTER, P. A. (2008). Steroid metabolism in breast cancer. *Minerva Endocrinol* 33, 27-37.
- FREUND, A., CHAUVEAU, C., BROUILLET, J. P., LUCAS, A., LACROIX, M., LICZNAR, A., VIGNON, F. & LAZENNEC, G. (2003). IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene* 22, 256-265.
- GAGO, F. E., FANELLI, M. A. & CIOCCA, D. R. (2006). Co-expression of steroid hormone receptors (estrogen receptor alpha and/or progesterone receptors) and Her2/neu (c-erbB-2) in breast cancer: clinical outcome following tamoxifen-based adjuvant therapy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 98, 36-40.
- GAMA, A., ALVES, A. & SCHMITT, F. (2008a). Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch* 453, 123-132.
- GAMA, A., ALVES, A. & SCHMITT, F. (2010). Expression and prognostic significance of CK19 in canine malignant mammary tumours. *Veterinary Journal* 184, 45-51.
- GAMA, A., PAREDES, J., GARTNER, F., ALVES, A. & SCHMITT, F. (2008b). Expression of E-cadherin, P-cadherin and beta-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *Veterinary Journal* 177, 45-53.
- GATTO, V., ARAGNO, M., GALLO, M., TAMAGNO, E., MARTINI, A., DI MONACO, M., BRIGNARDELLO, E. & BOCCUZZI, G. (1998). Dehydroepiandrosterone inhibits the growth of DMBA-induced rat mammary carcinoma via the androgen receptor. *Oncol Rep* 5, 241-243.
- GELALETI, G. B., JARDIM, B. V., LEONEL, C., MOSCHETTA, M. G. & ZUCCARI, D. A. (2012). Interleukin-8 as a prognostic serum marker in canine mammary gland neoplasias. *Vet Immunol Immunopathol* 146, 106-112.
- GENTSCHEV, I., STRITZKER, J., HOFMANN, E., WEIBEL, S., YU, Y. A., CHEN, N., ZHANG, Q., BULLERDIEK, J., NOLTE, I. & SZALAY, A. A. (2009). Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent. *Cancer Gene Ther* 16, 320-328.
- GILBERTSON, S. R., KURZMAN, I. D., ZACHRAU, R. E., HURVITZ, A. I. & BLACK, M. M. (1983). Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology* 20, 127-142.
- GIORDANO, S. H. (2003). Update on locally advanced breast cancer. *Oncologist* 8, 521-530.
- GIRGERT, R., EMONS, G. & GRUNDKER, C. (2012). Inactivation of GPR30 reduces growth of triple-negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy. *Breast cancer research and treatment* 134, 199-205.
- GIRGERT, R., EMONS, G. & GRUNDKER, C. (2014). Inhibition of GPR30 by estriol prevents growth stimulation of triple-negative breast cancer cells by 17beta-estradiol. *BMC Cancer* 14, 935.

- GOLDSCHMIDT, M., PENA, L., RASOTTO, R. & ZAPPULLI, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol* 48, 117-131.
- GONG, Y., WEI, W., WU, Y., UENO, N. T. & HUO, L. (2014). Expression of androgen receptor in inflammatory breast cancer and its clinical relevance. *Cancer* 120, 1775-1779.
- GONZALEZ-ANGULO, A. M., HENNESSY, B. T., BROGLIO, K., MERIC-BERNSTAM, F., CRISTOFANILLI, M., GIORDANO, S. H., BUCHHOLZ, T. A., SAHIN, A., SINGLETARY, S. E., BUZDAR, A. U. & HORTOBAGYI, G. N. (2007). Trends for inflammatory breast cancer: is survival improving? *Oncologist* 12, 904-912.
- GOODMAN, H. M. (2009). *Basic medical endocrinology*. Amsterdam ; Oxford, Academic.
- GOODMAN, M. T., TUNG, K. H. & WILKENS, L. R. (2006). Comparative epidemiology of breast cancer among men and women in the US, 1996 to 2000. *Cancer causes & control : CCC* 17, 127-136.
- GREENE, F. L., PAGE, D. L., FLEMING, I. D., FRITZ, A. G., BALCH, C. M. & HALLER, D. G. (2002). *Breast*. New York, Springer-Verlag.
- GREER, K. A., CANTERBERRY, S. C. & MURPHY, K. E. (2007). Statistical analysis regarding the effects of height and weight on life span of the domestic dog. *Research in veterinary science* 82, 208-214.
- GRUBER, C. J., TSCHUGGUEL, W., SCHNEEBERGER, C. & HUBER, J. C. (2002). Production and Actions of Estrogens. *New England Journal of Medicine* 346, 340-352.
- GUIL-LUNA, S., SANCHEZ-CEPESDES, R., MILLAN, Y., DE ANDRES, F. J., ROLLON, E., DOMINGO, V., GUSCETTI, F. & MARTIN DE LAS MULAS, J. (2011). Aglepristone decreases proliferation in progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *J Vet Intern Med* 25, 518-523.
- HAAGENSEN, C. D. (1971). *Diseases of the breast*. Philadelphia, Saunders.
- HAHNEL, R., TWADDLE, E. & VIVIAN, A. B. (1971). Estrogen receptors in human breast cancer. 2. In vitro binding of estradiol by benign and malignant tumors. *Steroids* 18, 681-708.
- HANCE, K. W., ANDERSON, W. F., DEVESA, S. S., YOUNG, H. A. & LEVINE, P. H. (2005). Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. *J Natl Cancer Inst* 97, 966-975.
- HAYNES, B. P., STRAUME, A. H., GEISLER, J., A'HERN, R., HELLE, H., SMITH, I. E., LONNING, P. E. & DOWSETT, M. (2010). Intratumoral estrogen disposition in breast cancer. *Clin Cancer Res* 16, 1790-1801.
- HELLMEN, E. (1993). Canine mammary tumour cell lines established in vitro. *J Reprod Fertil Suppl* 47, 489-499.

HELLMEN, E., BERGSTROM, R., HOLMBERG, L., SPANGBERG, I. B., HANSSON, K. & LINDGREN, A. (1993). Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol* 30, 20-27.

HENSON, K. L. (2001). Reproductive System. *Atlas of Canine and Feline Cytology*. R. E. Raskin and D. J. Meyer. Philadelphia, WB Saunders Co: 277-288.

HERMO, G. A., TURIC, E., ANGELICO, D., SCURSONI, A. M., GOMEZ, D. E., GOBELLO, C. & ALONSO, D. F. (2011). Effect of adjuvant perioperative desmopressin in locally advanced canine mammary carcinoma and its relation to histologic grade. *Journal of the American Animal Hospital Association* 47, 21-27.

HICKEY, T. E., ROBINSON, J. L., CARROLL, J. S. & TILLEY, W. D. (2012). Minireview: The androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? *Molecular endocrinology* 26, 1252-1267.

HIRKO, K. A., SOLIMAN, A. S., BANERJEE, M., RUTERBUSCH, J., HARFORD, J. B., CHAMBERLAIN, R. M., GRAFF, J. J., MERAJVER, S. D. & SCHWARTZ, K. (2013). Characterizing inflammatory breast cancer among Arab Americans in the California, Detroit and New Jersey Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) registries (1988-2008). *Springerplus* 2, 3.

HOBKIRK, R. (1993). Steroid sulfation Current concepts. *Trends Endocrinol Metab* 4, 69-74.

HOLLIDAY, D. L. & SPEIRS, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research : BCR* 13, 215.

HONG, Y., LI, H., YE, J., MIKI, Y., YUAN, Y. C., SASANO, H., EVANS, D. B. & CHEN, S. (2009). Epitope characterization of an aromatase monoclonal antibody suitable for the assessment of intratumoral aromatase activity. *PLoS One* 4, e8050.

HONMA, N., TAKUBO, K., SAWABE, M., ARAI, T., AKIYAMA, F., SAKAMOTO, G., UTSUMI, T., YOSHIMURA, N. & HARADA, N. (2006). Estrogen-metabolizing enzymes in breast cancers from women over the age of 80 years. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 607-613.

HORAS, K., ZHENG, Y., ZHOU, H. & SEIBEL, M. J. (2015). Animal Models for Breast Cancer Metastasis to Bone: Opportunities and Limitations. *Cancer investigation*, 1-10.

HOTES, J. L., ELLISON, L. F., HOWE, H. L., FRIESEN, I. & KOHLER, B. (2004). Variation in breast cancer counts using SEER and IARC multiple primary coding rules. *Cancer Causes Control* 15, 185-191.

ILLERA, J. C., LORENZO, P. L., SILVAN, G., MUNRO, C. J., ILLERA, M. J. & ILLERA, M. (1997). Enzyme immunoassay for testosterone and androstenedione in culture medium from rabbit oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 47, 1375-1388.

ILLERA, J. C., PÉREZ-ALENZA, M. D., NIETO, A., JIMÉNEZ, M. A., SILVÁN, G., DUNNER, S. & PEÑA, L. (2006). Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids* 71, 541-548.

- ILLERA, J. C., SILVAN, G. & ILLERA, M. (1992). Obtención de anticuerpos frente a esteroides para estudios inmunológicos. *Anales de la Real Academia de Farmacia* 58, 475-482.
- ILLERA, J. C., SILVAN, G., ILLERA, M. J. & ILLERA, M. (1993). Steroid hormone profiles in several domestic species and the methodology of determination thereof. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, 869-879.
- ILLERA, J. C., SILVÁN, G., PÉREZ-ALENZA, M. D., SÁNCHEZ-ARCHIDONA, A. R., NIETO, A. & PEÑA, L. (2003a). The possible role of IGF-I and androgens in the development of canine inflammatory mammary carcinoma. New York, Springer-Verlag.
- ILLERA, J. C., SILVAN, G. & PEREZ ALENZA, M. D. (2002). The role of IGF-I, binding proteins (BP3) and its receptor in canine inflammatory mammary tumors. *International Symposium in Cancer, New Trends in cancer for the 21st Century*.
- ILLERA, J. C., SILVAN, G., PEREZ ALENZA, M. D., SANCHEZ-ARCHIDONA, A. R., NIETO, A. & PENA, L. (2003b). The possible role of IGF-I and androgens in the development of canine inflammatory mammary carcinoma. New York, Springer-Verlag.
- ISOLA, J. J. (1993). Immunohistochemical demonstration of androgen receptor in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *J Pathol* 170, 31-35.
- ITOH, T., UCHIDA, K., ISHIKAWA, K., KUSHIMA, K., KUSHIMA, E., TAMADA, H., MORITAKE, T., NAKAO, H. & SHII, H. (2005). Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J Vet Med Sci* 67, 345-347.
- JAIYESIMI, I. A., BUZDAR, A. U. & HORTOBAGYI, G. (1992). Inflammatory breast cancer: a review. *J Clin Oncol* 10, 1014-1024.
- JARVINEN, T. A., PELTO-HUIKKO, M., HOLLI, K. & ISOLA, J. (2000). Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* 156, 29-35.
- JENSEN, E. V. (1975). Estrogen receptors in hormone-dependent breast cancers. *Cancer Res* 35, 3362-3364.
- JERRY, D. J., KITTRELL, F. S., KUPERWASSER, C., LAUCIRICA, R., DICKINSON, E. S., BONILLA, P. J., BUTEL, J. S. & MEDINA, D. (2000). A mammary-specific model demonstrates the role of the p53 tumor suppressor gene in tumor development. *Oncogene* 19, 1052-1058.
- JONES, C., PAYNE, J., WELLS, D., DELHANTY, J. D., LAKHANI, S. R. & KORTENKAMP, A. (2000). Comparative genomic hybridization reveals extensive variation among different MCF-7 cell stocks. *Cancer Genet Cytogenet* 117, 153-158.
- KARAYANNOPOULOU, M., KALDRYMIDOU, E., CONSTANTINIDIS, T. C. & DESSIRIS, A. (2005). Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology* 133, 246-252.

KAUFF, N. D., SATAGOPAN, J. M., ROBSON, M. E., SCHEUER, L., HENSLEY, M., HUDIS, C. A., and others (2002). Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 346, 1609-1615.

KAWABATA, A., YAMAMOTO, K., LAN, N. T., UCHIDA, K., YAMAGUCHI, R., HAYASHI, T. & TATEYAMA, S. (2006). Establishment and characterization of a cell line, MCO-Y4, derived from canine mammary gland osteosarcoma. *J Vet Med Sci* 68, 1047-1053.

KHONG, H. T. & RESTIFO, N. P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3, 999-1005.

KIM, J. H., YU, C. H., YHEE, J. Y., IM, K. S. & SUR, J. H. (2010). Lymphocyte infiltration, expression of interleukin (IL) -1, IL-6 and expression of mutated breast cancer susceptibility gene-1 correlate with malignancy of canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 142, 177-186.

KIM, N. H., LIM, H. Y., IM, K. S., SHIN, J. I., KIM, H. W. & SUR, J. H. (2014). Evaluation of clinicopathological characteristics and oestrogen receptor gene expression in oestrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *J Comp Pathol* 151, 42-50.

KLEER, C. G., VAN GOLEN, K. L. & MERAJVER, S. D. (2000). Molecular biology of breast cancer metastasis. *Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. Breast Cancer Res* 2, 423-429.

KLEINBERG, D. L., NIEMANN, W., FLAMM, E., COOPER, P., BABITSKY, G. & VALENSI, Q. (1985). Primate mammary development. Effects of hypophysectomy, prolactin inhibition, and growth hormone administration. *J Clin Invest* 75, 1943-1950.

KLOTZ, I. D. (1869). *Über mastitis carcinomatosa gravidarum et Lactarium*, Halle: These.

KNAPP, D. W. & WATERS, D. J. (1997). Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. *Mol Med Today* 3, 8-11.

KNUPFER, H., SCHMIDT, R., STANITZ, D., BRAUCKHOFF, M., SCHONFELDER, M. & PREISS, R. (2004). CYP2C and IL-6 expression in breast cancer. *Breast* 13, 28-34.

KOKAL, W. A., HILL, L. R., PORUDOMINSKY, D., BEATTY, J. D., KEMENY, M. M., RIIHIMAKI, D. U. & TERZ, J. J. (1985). Inflammatory breast carcinoma: a distinct entity? *J Surg Oncol* 30, 152-155.

KONIETSCHE, U., TESKE, E., JURINA, K. & STOCKHAUS, C. (2012). Palliative intralesional interleukin-2 treatment in dogs with urinary bladder and urethral carcinomas. *In Vivo* 26, 931-935.

KOVI, J., MOHLA, S., NORRIS, H. J., SAMPSON, C. C. & HESHMAT, M. Y. (1989). Breast lesions in black women. *Pathol Annu* 24 Pt 1, 199-218.

KOZŁOWSKI, L., ZAKRZEWSKA, I., TOKAJUK, P. & WOJTUKIEWICZ, M. Z. (2003). Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz Akad Med Białymst* 48, 82-84.

- KUENEN-BOUMEEESTER, V., VAN DER KWAST, T. H., CLAASSEN, C. C., LOOK, M. P., LIEM, G. S., KLIJN, J. G. & HENZEN-LOGMANS, S. C. (1996). The clinical significance of androgen receptors in breast cancer and their relation to histological and cell biological parameters. *Eur J Cancer* 32A, 1560-1565.
- KUMARAGURUPARAN, R., PRATHIBA, D. & NAGINI, S. (2006). Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res Vet Sci* 81, 218-224.
- LABRIE, F. (2003). Extragonadal synthesis of sex steroids: intracrinology. *Ann Endocrinol (Paris)* 64, 95-107.
- LABRIE, F., LUU-THE, V., LABRIE, C., BELANGER, A., SIMARD, J., LIN, S. X & PELLETIER, G. (2003). Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. *Endocr Rev* 24, 152-182.
- LACROIX, M. & LECLERCQ, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast cancer research and treatment* 83, 249-289.
- LAKHANI, S. R., ELLIS, I.O., SCHNITT, S.J., TAN, P.H., VAN DE VIJVER, M.J. (2012). WHO Classification of Tumours of the Breast. Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- LANA, S. E., RUTTEMAN, G. R. & WITHROW, S. J. (2007). Tumors of the mammary gland. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. S. J. Withrow and D. M. Vail. St. Louis, Missouri, Saunders Elsevier: 619-636.
- LANTINGA-VAN LEEUWEN, I. S., VAN GARDEREN, E., RUTTEMAN, G. R. & MOL, J. A. (2000). Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 75, 219-228.
- LASFARGUES, E. Y. & OZZELLO, L. (1958). Cultivation of human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 21, 1131-1147.
- LE, M. G., ARRIAGADA, R., BAHL, J., PFEIFFER, F., CAMMOUN, M., TABBANE, F. & RUBINO, C. (2006). Are risk factors for breast cancer similar in women with inflammatory breast cancer and in those with non-inflammatory breast cancer? *Breast* 15, 355-362.
- LEARMONT, G. E. (1916). Acute mammary carcinoma, (Volkman's Mastitis Carcinomatosa). *Can Med Assoc J* 6, 499-511.
- LEITCH, A. (1909). Peau d'orange in acute mammary carcinoma: its causes and diagnostic value. *Lancet Oncol* 1, 861-863.
- LEVINE, H., BALICER, R. D., ROZHAVSKI, V., HALPERIN, T., SHREBERK, M., DAVIDOVITCH, N., HUERTA-HARTAL, M. & ANKOL, O. E. (2012). Seroepidemiology of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus among Israeli male young adults. *Annals of epidemiology* 22, 783-788.
- LEVINE, P. H. (2004). Factors for the development of aggressive inflammatory and non-inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 88 Suppl 1:S91.

- LEVINE, P. H., MESA-TEJADA, R., KEYDAR, I., TABBANE, F., SPIEGELMAN, S. & MOURALI, N. (1984). Increased incidence of mouse mammary tumor virus-related antigen in Tunisian patients with breast cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 33, 305-308.
- LEVINE, P. H. & VENEROSO, C. (2008). The epidemiology of inflammatory breast cancer. *Semin Oncol* 35, 11-16.
- LEWIS, A. M., VARGHESE, S., XU, H. & ALEXANDER, H. R. (2006). Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med.* Nov 4-48.
- LI, S., YAN, X., BELANGER, A. & LABRIE, F. (1994). Prevention by dehydroepiandrosterone of the development of mammary carcinoma induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in the rat. *Breast Cancer Res Treat* 29, 203-217.
- LIAO, D. J. & DICKSON, R. B. (2002). Roles of androgens in the development, growth, and carcinogenesis of the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80, 175-189.
- LILLIE, E. O., BERNSTEIN, L. & URSIN, G. (2003). The role of androgens and polymorphisms in the androgen receptor in the epidemiology of breast cancer. *Breast Cancer Res* 5, 164-173.
- LIN, Y., HUANG, R., CHEN, L., LI, S., SHI, Q., JORDAN, C. & HUANG, R. P. (2004). Identification of interleukin-8 as estrogen receptor-regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays. *Int J Cancer* 109, 507-515.
- LIPPMAN, M., BOLAN, G. & HUFF, K. (1976). The effects of androgens and antiandrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res* 36, 4610-4618.
- LIU, D., XIONG, H., ELLIS, A. E., NORTHRUP, N. C., RODRIGUEZ, C. O., JR., O'REGAN, R. M., DALTON, S. & ZHAO, S. (2014). Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. *Cancer Res* 74, 5045-5056.
- LONGCOPE, C. (1986). Adrenal and gonadal androgen secretion in normal females. *Clinics in endocrinology and metabolism* 15, 213-228.
- LONNING, P. E., HELLE, H., DUONG, N. K., EKSE, D., AAS, T. & GEISLER, J. (2009). Tissue estradiol is selectively elevated in receptor positive breast cancers while tumour estrone is reduced independent of receptor status. *J Steroid Biochem Mol Biol* 117, 31-41.
- LYKKESFELDT, A. E., HENRIKSEN, K. L., RASMUSSEN, B. B., SASANO, H., EVANS, D. B., MOLLER, S., EJLERTSEN, B. & MOURIDSEN, H. T. (2009). In situ aromatase expression in primary tumor is associated with estrogen receptor expression but is not predictive of response to endocrine therapy in advanced breast cancer. *BMC Cancer* 9, 185.
- LYON, D. E., MCCAIN, N. L., WALTER, J. & SCHUBERT, C. (2008). Cytokine comparisons between women with breast cancer and women with a negative breast biopsy. *Nurs Res* 57, 51-58.

- MAALEJ, M., FRIKHA, H., BEN SALEM, S., DAOUD, J., BOUAOUINA, N., BEN ABDALLAH, M. & BEN ROMDHANE, K. (1999). [Breast cancer in Tunisia: clinical and epidemiological study]. *Bull Cancer* 86, 302-306.
- MACEWEN, E. G. (1990). Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Rev* 9, 125-136.
- MAINENTI, M., RASOTTO, R., CARNIER, P. & ZAPPULLI, V. (2014). Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. *Vet J* 202, 62-68.
- MALOISEL, F., DUFOUR, P., BERGERAT, J. P., HERBRECHT, R., DUCLOS, B., BOILLETOT, A., GIRON, C., JAECK, D., HAENNEL, P., JUNG, G. & ET AL. (1990). Results of initial doxorubicin, 5-fluorouracil, and cyclophosphamide combination chemotherapy for inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 65, 851-855.
- MANN, S., LAUCIRICA, R., CARLSON, N., YOUNES, P. S., ALI, N., YOUNES, A., LI, Y. & YOUNES, M. (2001). Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 32, 113-118.
- MARCONATO, L., ROMANELLI, G., STEFANELLO, D., GIACOBONI, C., BONFANTI, U., BETTINI, G., FINOTELLO, R., VERGANTI, S., VALENTI, P., CIARAMELLA, L. & ZINI, E. (2009). Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 235, 967-972.
- MARINELLI, L., GABAI, G., WOLFSWINKEL, J. & MOL, J. A. (2004). Mammary steroid metabolizing enzymes in relation to hyperplasia and tumorigenesis in the dog. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92, 167-173.
- MARKOPOULOS, C., BERGER, U., WILSON, P., GAZET, J. C. & COOMBES, R. C. (1988). Oestrogen receptor content of normal breast cells and breast carcinomas throughout the menstrual cycle. *Br Med J (Clin Res Ed)* 296, 1349-1351.
- MARTÍN DE LAS MULAS, J., ORDÁS, J., MILLÁN, M. Y., CHACÓN, F., DE LARA, M., ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A., REYMUNDO, C. & JOVER, A. (2004). Immunohistochemical expression of estrogen receptor beta in normal and tumoral canine mammary glands. *Vet Pathol* 41, 269-272.
- MARTIN DE LAS MULAS, J., ORDAS, J., MILLAN, Y., FERNANDEZ-SORIA, V. & RAMON Y CAJAL, S. (2003). Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res Treat* 80, 363-367.
- MARTÍNEZ-CARPIO, P. A., NAVARRO, M.A. (2003). El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Rev Oncol* 5, 184-191.
- MATOS, A. J., LOPES, C., CARVALHEIRA, J., SANTOS, M., RUTTEMAN, G. R. & GARTNER, F. (2006). E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. *Journal of Comparative Pathology* 134, 182-189.

- MCCORMICK, D. L., RAO, K. V., JOHNSON, W. D., BOWMAN-GRAM, T. A., STEELE, V. E., LUBET, R. A. & KELLOF, G. J. (1996). Exceptional chemopreventive activity of low-dose dehydroepiandrosterone in the rat mammary gland. *Cancer Res* 56, 1724-1726.
- MELBYE, M., WOHLFAHRT, J., OLSEN, J. H., FRISCH, M., WESTERGAARD, T., HELWEG-LARSEN, K. & ANDERSEN, P. K. (1997). Induced abortion and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 336, 81-85.
- MERENDINO, R. A., ARENA, A., CAPOZZA, A. B., CHILLEMI, S. & MESITI, M. (1996). Serum levels of interleukin-10 in patients affected by breast cancer. *Immunol Lett* 53, 59-60.
- MEUTEN, D. J. (2002). Tumors in domestic animals. Ames, Iowa, Iowa State University Press ; [Oxford : Blackwell] [distributor].
- MILLANTA, F., CALANDRELLA, M., BARI, G., NICCOLINI, M., VANNOZZI, I. & POLI, A. (2005). Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res Vet Sci* 79, 225-232.
- MILLANTA, F., CANESCHI, V., RESSEL, L., CITI, S. & POLI, A. (2009). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Inflammatory and Non-inflammatory Mammary Carcinoma. *J Comp Pathol*.
- MILLANTA, F., CITI, S., DELLA SANTA, D., PORCIANI, M. & POLI, A. (2006a). COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Res Treat* 98, 115-120.
- MILLANTA, F., SILVESTRI, G., VASELLI, C., CITI, S., PISANI, G., LORENZI, D. & POLI, A. (2006b). The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Res Vet Sci* 81, 350-357.
- MILLANTA, F., VERIN, R., ASPRONI, P., GIANNETTI, G. & POLI, A. (2012). A case of feline primary inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical findings. *Journal of feline medicine and surgery* 14, 420-423.
- MILLER, L. J., KURTZMAN, S. H., WANG, Y., ANDERSON, K. H., LINDQUIST, R. R. & KREUTZER, D. L. (1998). Expression of interleukin-8 receptors on tumor cells and vascular endothelial cells in human breast cancer tissue. *Anticancer Res* 18, 77-81.
- MILLER, W. R., ANDERSON, T. J., EVANS, D. B., KRAUSE, A., HAMPTON, G. & DIXON, J. M. (2003). An integrated view of aromatase and its inhibition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86, 413-421.
- MILLER, W. R., ANDERSON, T. J. & JACK, W. J. (1990). Relationship between tumour aromatase activity, tumour characteristics and response to therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37, 1055-1059.
- MILLER, W. R., TELFORD, J., DIXON, J. M. & SHIVAS, A. A. (1985). Androgen metabolism and apocrine differentiation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 5, 67-73.

- MISDORP, W. (2002). Tumors of the mammary gland. Tumors in domestic animals. D. J. Meuten, Wiley-Blackwell: 575-588.
- MISDORP, W., ELSE, R. W., HELLMEN, E. & LIPSCOMB, T. P. (1999). Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat. World Human Organization VII.
- MISDORP, W. & ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (WASHINGTON). COLLABORATING CENTER FOR COMPARATIVE ONCOLOGY (1999). Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology : American Registry of Pathology : World Health Organization Collaborating Center for Comparative Oncology.
- MOINFAR, F., OKCU, M., TSYBROVSKYY, O., REGITNIG, P., LAX, S. F., WEYBORA, W., RATSCHEK, M., TAVASSOLI, F. A. & DENK, H. (2003). Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas: potential relevance to new therapeutic strategies. *Cancer* 98, 703-711.
- MOL, J. A., SELMAN, P. J., SPRANG, E. P., VAN NECK, J. W. & OOSTERLAKEN-DIJKSTERHUIS, M. A. (1997). The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *J Reprod Fertil Suppl* 51, 339-344.
- MOORADIAN, A. D., MORLEY, J. E. & KORENMAN, S. G. (1987). Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 8, 1-28.
- MOORE, A. S., THEILEN, G. H., NEWELL, A. D., MADEWELL, B. R. & RUDOLF, A. R. (1991). Preclinical study of sequential tumor necrosis factor and interleukin 2 in the treatment of spontaneous canine neoplasms. *Cancer Res* 51, 233-238.
- MOORE, K. W., O'GARRA, A., DE WAAL MALEFYT, R., VIEIRA, P. & MOSMANN, T. R. (1993). Interleukin-10. *Annual review of immunology* 11, 165-190.
- MORI, M., TOMINAGA, T. & TAMAOKI, B. I. (1978). Steroid metabolism in normal mammary gland and in the dimethylbenzanthracene-induced mammary tumor of rats. *Endocrinology* 102, 1387-1397.
- MORRIS, J. S., DOBSON, J. M. & BOSTOCK, D. E. (1993). Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *Vet Rec* 133, 539-542.
- MOURALI, N., MUENZ, L. R., TABBANE, F., BELHASSEN, S., BAHJ, J. & LEVINE, P. H. (1980). Epidemiologic features of rapidly progressing breast cancer in Tunisia. *Cancer* 46, 2741-2746.
- MOYNAHAN, M. E. (2002). The cancer connection: BRCA1 and BRCA2 tumor suppression in mice and humans. *Oncogene* 21, 8994-9007.
- MUNSON, L. & MORESCO, A. (2007). Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. *Breast Dis* 28, 7-21.
- MURPHY, L. C. & LEYGUE, E. (2012). The role of estrogen receptor-beta in breast cancer. *Seminars in reproductive medicine* 30, 5-13.

NAMBA, R., MAGLIONE, J. E., YOUNG, L. J., BOROWSKY, A. D., CARDIFF, R. D., MACLEOD, C. L. & GREGG, J. P. (2004). Molecular characterization of the transition to malignancy in a genetically engineered mouse-based model of ductal carcinoma in situ. *Mol Cancer Res* 2, 453-463.

NELSON, L. R. & BULUN, S. E. (2001). Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45, S116-124.

NEVE, R. M., CHIN, K., FRIDLYAND, J., YEH, J., BAEHNER, F. L., FEVR, T., and others (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10, 515-527.

NICOLAS DIAZ-CHICO, B., GERMAN RODRIGUEZ, F., GONZALEZ, A., RAMIREZ, R., BILBAO, C., CABRERA DE LEON, A., AGUIRRE JAIME, A., CHIRINO, R., NAVARRO, D. & DIAZ-CHICO, J. C. (2007). Androgens and androgen receptors in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 105, 1-15.

NIETO, A., PEÑA, L., PÉREZ-ALENZA, M. D., SÁNCHEZ, M. A., FLORES, J. M. & CASTAÑO, M. (2000). Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 37, 239-247.

NIETO, A., PÉREZ ALENZA, M. D. & PEÑA, L. (2002). Insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR), progesteron receptor (PR) and androgen receptor (AR) are highly expressed in canine inflammatory mammary carcinoma. 20th Meeting of European Society of Veterinary Pathology.

NORVAL, M., MAINGAY, J. & ELSE, R. W. (1984a). Studies of three canine mammary carcinoma cell lines--I. In vitro properties. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20, 1489-1500.

NORVAL, M., MAINGAY, J. & ELSE, R. W. (1984b). Studies of three canine mammary cell lines--II. In vivo properties. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20, 1501-1508.

OPRIC, S., OPRIC, D., GUGIC, D. & GRANIC, M. (2012). Phyllodes tumors and fibroadenoma common beginning and different ending. *Collegium antropologicum* 36, 235-241.

OWEN, L. N. (1980). TNM : classification of tumours in domestic animals. Geneve, World Health Organization.

PAPIERNIK, M., DO CARMO LEITE-DE-MORAES, M., PONTOUX, C., JORET, A. M., ROCHA, B., PENIT, C. & DY, M. (1997). T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL-10-producing T cell population with infectious capacity. *Journal of immunology* 158, 4642-4653.

PARADISO, A., TOMMASI, S., BRANDI, M., MARZULLO, F., SIMONE, G., LORUSSO, V., MANGIA, A. & DE LENA, M. (1989). Cell kinetics and hormonal receptor status in inflammatory breast carcinoma. Comparison with locally advanced disease. *Cancer* 64, 1922-1927.

- PAWLOWSKI, K. M., KROL, M., MAJEWSKA, A., BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, A., MOL, J. A., MALICKA, E. & MOTYL, T. (2009). Comparison of cellular and tissue transcriptional profiles in canine mammary tumor. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 1, 85-94.
- PEÑA, L., DE ANDRES, P. J., CLEMENTE, M., CUESTA, P. & PEREZ-ALENZA, M. D. (2013). Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol* 50, 94-105.
- PEÑA, L., GAMA, A., GOLDSCHMIDT, M. H., ABADIE, J., BENAZZI, C., CASTAGNARO, M., and others (2014). Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* 51, 127-145.
- PEÑA, L., PÉREZ-ALENZA, M. D., RODRÍGUEZ-BERTOS, A. & NIETO, A. (2003a). Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res Treat* 78, 141-148.
- PEÑA, L., SILVÁN, G., NIETO, A. & AL., E. (2002). Serum and tissue androgen concentrations in dogs with inflammatory mammary carcinoma (IMC) comparing to other mammary tumors. Androgen receptor status. 20th Meeting of European Society of Veterinary Pathology.
- PEÑA, L., SILVÁN, G., PÉREZ-ALENZA, M. D., NIETO, A. & ILLERA, J. C. (2003b). Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84, 211-216.
- PEÑA, L. L., NIETO, A. I., PÉREZ-ALENZA, D., CUESTA, P. & CASTAÑO, M. (1998). Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest* 10, 237-246.
- PEREL, E., BLACKSTEIN, M. E. & KILLINGER, D. W. (1982). Aromatase in human breast carcinoma. *Cancer Res* 42, 3369s-3372s.
- PEREL, E., DAVIS, S. & KILLINGER, D. W. (1981). Androgen metabolism in male and female breast tissue. *Steroids* 37, 345-352.
- PEREL, E. & KILLINGER, D. W. (1983). The metabolism of androstenedione and testosterone to C19 metabolites in normal breast, breast carcinoma and benign prostatic hypertrophy tissue. *J Steroid Biochem* 19, 1135-1139.
- PÉREZ-ALENZA, M. D., JIMÉNEZ, A., NIETO, A. I. & PEÑA, L. (2004). First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Cancer Res* 6, R300-307.
- PÉREZ-ALENZA, M. D., PEÑA, L., NIETO, A. I. & CASTAÑO, M. (1997). Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Ann Ist Super Sanita* 33, 581-585.

PÉREZ-ALENZA, M. D., TABANERA, E. & PEÑA, L. (2001). Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 219, 1110-1114.

PEREZ ALENZA, M. D., TABANERA, E. & PENA, L. (2001). Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *J Am Vet Med Assoc* 219, 1110-1114.

PERRIER, S., CALDEFIE-CHEZET, F. & VASSON, M. P. (2009). IL-1 family in breast cancer: potential interplay with leptin and other adipocytokines. *FEBS Lett* 583, 259-265.

PHILIBERT, J. C., SNYDER, P. W., GLICKMAN, N., GLICKMAN, L. T., KNAPP, D. W. & WATERS, D. J. (2003). Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 17, 102-106.

POGO, B. G., HOLLAND, J. F. & LEVINE, P. H. (2010). Human mammary tumor virus in inflammatory breast cancer. *Cancer* 116, 2741-2744.

PORT LOUIS, L. R., VARSHNEY, K. C. & NAIR, M. G. (2012). An immunohistochemical study on the expression of sex steroid receptors in canine mammary tumors. *ISRN Vet Sci* 2012, 378607.

PRATT, W. B. & TOFT, D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18, 306-360.

PRIOSERYANTO, B. P., TATEYAMA, S., YAMAGUCHI, R. & UCHIDA, K. (1995). Establishment of a cell line (MCM-B2) from a benign mixed tumour of canine mammary gland. *Res Vet Sci* 58, 272-276.

PUROHIT, A., NEWMAN, S. P. & REED, M. J. (2002). The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Res* 4, 65-69.

PUROHIT, A., WOO, L. W., CHANDER, S. K., NEWMAN, S. P., IRESON, C., HO, Y., GRASSO, A., LEESE, M. P., POTTER, B. V. & REED, M. J. (2003). Steroid sulphotase inhibitors for breast cancer therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86, 423-432.

QUEIROGA, F. L., PEREZ-ALENZA, M. D., SILVAN, G., PENA, L., LOPES, C. & ILLERA, J. C. (2005). Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94, 181-187.

QUEIROGA, F. L., PEREZ-ALENZA, M. D., SILVAN, G., PENA, L., LOPES, C. S. & ILLERA, J. C. (2008). Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17beta-estradiol) in canine mammary tumours. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110, 76-82.

QUEIROGA, F. L., PIRES, I., LOBO, L. & LOPES, C. S. (2010). The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Research in veterinary science* 88, 441-445.

RASCH, C. (1931). Carcinoma erysipeloides. *Br J Derm Syph* 43, 351-354.

- RASOTTO, R., GOLDSCHMIDT, M. H., CASTAGNARO, M., CARNIER, P., CALIARI, D. & ZAPPULLI, V. (2014). The dog as a natural animal model for study of the mammary myoepithelial basal cell lineage and its role in mammary carcinogenesis. *J Comp Pathol* 151, 166-180.
- RASOTTO, R., ZAPPULLI, V., CASTAGNARO, M. & GOLDSCHMIDT, M. H. (2012). A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. *Veterinary Pathology* 49, 330-340.
- RAZANDI, M., OH, P., PEDRAM, A., SCHNITZER, J. & LEVIN, E. R. (2002). ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Molecular endocrinology* 16, 100-115.
- RECCHIONE, C., VENTURELLI, E., MANZARI, A., CAVALLERI, A., MARTINETTI, A. & SECRETO, G. (1995). Testosterone, dihydrotestosterone and oestradiol levels in postmenopausal breast cancer tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52, 541-546.
- REED, M. J., COLDHAM, N. G., PATEL, S. R., GHILCHIK, M. W. & JAMES, V. H. (1992). Interleukin-1 and interleukin-6 in breast cyst fluid: their role in regulating aromatase activity in breast cancer cells. *J Endocrinol* 132, R5-8.
- REESE, J. M., SUMAN, V. J., SUBRAMANIAM, M., WU, X., NEGRON, V., GINGERY, A., and others (2014). ERbeta1: characterization, prognosis, and evaluation of treatment strategies in ERalpha-positive and -negative breast cancer. *BMC Cancer* 14, 749.
- RESETKOVA, E. (2008). Pathologic aspects of inflammatory breast carcinoma: part 1. Histomorphology and differential diagnosis. *Semin Oncol* 35, 25-32.
- REVANKAR, C. M., CIMINO, D. F., SKLAR, L. A., ARTERBURN, J. B. & PROSSNITZ, E. R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307, 1625-1630.
- RICKETTS, D., TURNBULL, L., RYALL, G., BAKHSHI, R., RAWSON, N. S., GAZET, J. C., NOLAN, C. & COOMBES, R. C. (1991). Estrogen and progesterone receptors in the normal female breast. *Cancer Res* 51, 1817-1822.
- RICHARDS, J. A., PETREL, T. A. & BRUEGGEMEIER, R. W. (2002). Signaling pathways regulating aromatase and cyclooxygenases in normal and malignant breast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80, 203-212.
- RIJNBERK, A. & KOOISTRA, H. S. (2010). Clinical endocrinology of dogs and cats : an illustrated text. Hannover, Schlütersche.
- RIVA, C., DAINESE, E., CAPRARA, G., ROCCA, P. C., MASSARELLI, G., TOT, T., CAPELLA, C. & EUSEBI, V. (2005). Immunohistochemical study of androgen receptors in breast carcinoma. Evidence of their frequent expression in lobular carcinoma. *Virchows Arch* 447, 695-700.

ROGER, P., SAHLA, M. E., MAKELA, S., GUSTAFSSON, J. A., BALDET, P. & ROCHEFORT, H. (2001). Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 61, 2537-2541.

ROSEN, P. P. (1996). *Rosen's Breast Pathology*. Philadelphia.

ROSNER, B., COLDITZ, G. A. & WILLETT, W. C. (1994). Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 139, 819-835.

ROTA, A., VERONESI, M. C., VOLPE, S., RICCARDI, A. & BATTOCCHIO, M. (2007). Estradiol-17beta, progesterone and testosterone plasma concentrations during estrus in the bitch. *Veterinary research communications* 31 Suppl 1, 197-199.

ROTH, G. S., MATTISON, J. A., OTTINGER, M. A., CHACHICH, M. E., LANE, M. A. & INGRAM, D. K. (2004). Aging in rhesus monkeys: relevance to human health interventions. *Science* 305, 1423-1426.

RUIZ SIMÓN, A., CLIMENT, M. A., LLUCH, A., LOMBART, A., MOYA, V., FERNANDEZ-MARTOS, C. & GUILLÉN, V. (2000). Inflammatory Breast Carcinoma: pathological or clinical entity? *Breast Cancer Res and Treat* 64, 269-273.

RUTTEMAN, G. R. (1990). Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update. *In Vivo* 4, 33-40.

RUTTEMAN, G. R., WITHROW, S. J. & MACEWEN, E. G. (2000). *Tumors of the Mammary Gland. Small Animal Clinical Oncology*. M. E. Withrow SJ. Philadelphia, WB Saunders Co: 450-467.

SABA, C. F., ROGERS, K. S., NEWMAN, S. J., MAULDIN, G. E. & VAIL, D. M. (2007). Mammary gland tumors in male dogs. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 21, 1056-1059.

SALTZSTEIN, S. L. (1974). Clinically occult inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 34, 382-388.

SANCHEZ-ARCHIDONA, A. R., JIMENEZ, M. A., PEREZ-ALENZA, D., SILVAN, G., ILLERA, J. C., PENA, L. & DUNNER, S. (2007). Steroid pathway and oestrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104, 93-99.

SANTOS, A., LOPES, C., MARQUES, R. M., AMORIM, I., RIBEIRO, J., FRIAS, C., VICENTE, C., GARTNER, F. & DE MATOS, A. (2011). Immunohistochemical analysis of urokinase plasminogen activator and its prognostic value in canine mammary tumours. *Veterinary Journal* 189, 43-48.

SANTOS, A. A., OLIVEIRA, J. T., LOPES, C. C., AMORIM, I. F., VICENTE, C. M., GARTNER, F. R. & MATOS, A. J. (2010). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 143, 268-275.

SARLI, G., PREZIOSI, R., BENAZZI, C., CASTELLANI, G. & MARCATO, P. S. (2002). Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *Journal of*

veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 14, 25-34.

SARVILINNA, N., ERONEN, H., MIETTINEN, S., VIENONEN, A. & YLIKOMI, T. (2006). Steroid hormone receptors and coregulators in endocrine-resistant and estrogen-independent breast cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 118, 832-840.

SASANO, H., ANDERSON, T. J., SILVERBERG, S. G., SANTEN, R. J., CONWAY, M., EDWARDS, D. P., KRAUSE, A., BHATNAGAR, A. S., EVANS, D. B. & MILLER, W. R. (2005). The validation of new aromatase monoclonal antibodies for immunohistochemistry--a correlation with biochemical activities in 46 cases of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 95, 35-39.

SASANO, H. & HARADA, N. (1998). Intratumoral aromatase in human breast, endometrial, and ovarian malignancies. *Endocr Rev* 19, 593-607.

SASANO, H., NAGURA, H., HARADA, N., GOUKON, Y. & KIMURA, M. (1994). Immunolocalization of aromatase and other steroidogenic enzymes in human breast disorders. *Hum Pathol* 25, 530-535.

SASANO, H., SUZUKI, T., MIKI, Y. & MORIYA, T. (2008). Intracrinology of estrogens and androgens in breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108, 181-185.

SASANO, H., SUZUKI, T., NAKATA, T. & MORIYA, T. (2006). New development in intracrinology of breast carcinoma. *Breast Cancer* 13, 129-136.

SASSI, F., BENAZZI, C., CASTELLANI, G. & SARLI, G. (2010). Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC veterinary research* 6, 5.

SCHNEIDER, R., DORN, C. R. & TAYLOR, D. O. (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst* 43, 1249-1261.

SCHUMANN, E. A. (1911). V. A Study of Carcinoma Mastitoides. *Ann Surg* 54, 69-77.

SECRETO, G., TONIOLO, P., PISANI, P., RECCHIONE, C., CAVALLERI, A., FARISELLI, G., TOTIS, A., DI PIETRO, S. & BERRINO, F. (1989). Androgens and breast cancer in premenopausal women. *Cancer Res* 49, 471-476.

SECRETO, G., VENTURELLI, E., BUCCI, A., PIROMALLI, D., FARISELLI, G. & GALANTE, E. (1996). Intratumour amount of sex steroids in elderly breast cancer patients. An approach to the biological characterization of mammary tumours in the elderly. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58, 557-561.

SEER. (2005). "Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program."

SELIM, A. G., EL-AYAT, G. & WELLS, C. A. (2002). Androgen receptor expression in ductal carcinoma in situ of the breast: relation to oestrogen and progesterone receptors. *J Clin Pathol* 55, 14-16.

- SHENTON, K. C., DOWSETT, M., LU, Q., BRODIE, A., SASANO, H., SACKS, N. P. & ROWLANDS, M. G. (1998). Comparison of biochemical aromatase activity with aromatase immunohistochemistry in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 49 Suppl 1, S101-107; discussion S109-119.
- SHIRAKAWA, K., KOBAYASHI, H., SOBAJIMA, J., HASHIMOTO, D., SHIMIZU, A. & WAKASUGI, H. (2003). Inflammatory breast cancer: vasculogenic mimicry and its hemodynamics of an inflammatory breast cancer xenograft model. *Breast Cancer Res* 5, 136-139.
- SHIRAKAWA, K., TSUDA, H., HEIKE, Y., KATO, K., ASADA, R., INOMATA, M., and others (2001). Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer. *Cancer Res* 61, 445-451.
- SILVAN, G., ILLERA, J. C. & ILLERA, M. (1993). Determination of follicular fluid estradiol levels by enzyme-linked immunosorbent assay. *Steroids* 58, 324-329.
- SILVAN, G., ILLERA, J. C., PEREZ ALENZA, M. D. & AL., E. (2003). The possible role of IGF-I and estrogens in the development of canine inflammatory mammary carcinoma. XXXIII Congress of SSPS.
- SINGLETERY, S. E., ALLRED, C., ASHLEY, P., BASSETT, L. W., BERRY, D., BLAND, K. I., and others (2002). Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 20, 3628-3636.
- SKLIRIS, G. P., CARDER, P. J., LANSDOWN, M. R. & SPEIRS, V. (2001). Immunohistochemical detection of ERbeta in breast cancer: towards more detailed receptor profiling? *Br J Cancer* 84, 1095-1098.
- SLOTIN, C. A., HEAP, R. B., CHRISTIANSEN, J. M. & LINZELL, J. L. (1970). Synthesis of progesterone by the mammary gland of the goat. *Nature* 225, 385-386.
- SMITH, I. E. & DOWSETT, M. (2003). Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med* 348, 2431-2442.
- SOBIN, L. H. & WITTEKIND, C. (2002). TNM classification of malignant tumours. New York ; [Chichester], Wiley-Liss.
- SORENMO, K. U., RASOTTO, R., ZAPPULLI, V. & GOLDSCHMIDT, M. H. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol* 48, 85-97.
- SOULE, H. D., VAZGUEZ, J., LONG, A., ALBERT, S. & BRENNAN, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-1416.
- STANCZYK, F. Z., MATHEWS, B. W. & SHERMAN, M. E. (2015). Relationships of sex steroid hormone levels in benign and cancerous breast tissue and blood: A critical appraisal of current science. *Steroids* 99, 91-102.

- SUGIMOTO, T., MARUO, K., IMAEDA, Y., SUZUKI, K., SHIROTA, K., EJIMA, H., ENDO, S. & NOMURA, T. (1994). Xenotransplantation of canine tumors into severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J Vet Med Sci* 56, 1087-1091.
- SUSANECK, S. J., ALLEN, T. A., HOOPES, J., WITHROW, S. J. & MACY, D. W. (1983). Inflammatory mammary carcinoma in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 9, 971-976.
- SUZUKI, T., MIKI, Y., MORIYA, T., AKAHIRA, J., HIRAKAWA, H., OHUCHI, N. & SASANO, H. (2007). In situ production of sex steroids in human breast carcinoma. *Med Mol Morphol* 40, 121-127.
- SUZUKI, T., MORIYA, T., ISHIDA, T., OHUCHI, N. & SASANO, H. (2003). Intracrine mechanism of estrogen synthesis in breast cancer. *Biomed Pharmacother* 57, 460-462.
- TARARA, R. P. (2007). Review of mammary gland neoplasia in nonhuman primates. *Breast disease* 28, 23-27.
- TAVASSOLI, F. A. (1999a). *Inflammatory Carcinoma, Infiltrating Carcinomas: Special Types*. New York.
- TAVASSOLI, F. A. (1999b). *Pathology of the breast*. New York ; London, McGraw-Hill.
- TAYLOR, G. & MELTZER (1938). Inflammatory carcinoma of the breast. *Am J Cancer* 33, 33-49.
- THIJSEN, J. H., BLANKENSTEIN, M. A., DONKER, G. H. & DAROSZEWSKI, J. (1991). Endogenous steroid hormones and local aromatase activity in the breast. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39, 799-804.
- TREVES, N. (1953). Inflammatory carcinoma of the breast in the male patient. *Surgery* 34, 810-820.
- TRICHOPOULOS, D., MACMAHON, B. & COLE, P. (1972). Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 48, 605-613.
- TURTON, N. J., JUDAH, D. J., RILEY, J., DAVIES, R., LIPSON, D., STYLES, J. A., SMITH, A. G. & GANT, T. W. (2001). Gene expression and amplification in breast carcinoma cells with intrinsic and acquired doxorubicin resistance. *Oncogene* 20, 1300-1306.
- UVA, P., AURISICCHIO, L., WATTERS, J., LOBODA, A., KULKARNI, A., CASTLE, J., and others (2009). Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics* 10, 135.
- VAIL, D. M. & MACEWEN, E. G. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest* 18, 781-792.
- VAN DER AUWERA, I., VAN LAERE, S. J., VAN DEN EYNDEN, G. G., BENOY, I., VAN DAM, P., COLPAERT, C. G., FOX, S. B., TURLEY, H., HARRIS, A. L., VAN MARCK, E. A., VERMEULEN, P. B. & DIRIX, L. Y. (2004). Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification. *Clin Cancer Res* 10, 7965-7971.

VAN GOLEN, K. L., WU, Z. F., QIAO, X. T., BAO, L. & MERAJVER, S. D. (2000b). RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells. *Neoplasia* 2, 418-425.

VAN GOLEN, K. L., WU, Z. F., QIAO, X. T., BAO, L. W. & MERAJVER, S. D. (2000a). RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res* 60, 5832-5838.

VARGO-GOGOLA, T. & ROSEN, J. M. (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature reviews. Cancer* 7, 659-672.

VERHASSELT, B., VAN DAMME, J., VAN LAREBEKE, N., PUT, W., BRACKE, M., DE POTTER, C. & MAREEL, M. (1992). Interleukin-1 is a motility factor for human breast carcinoma cells in vitro: additive effect with interleukin-6. *Eur J Cell Biol* 59, 449-457.

VERMEULEN, A., DESLYPERE, J. P. & PARIDAENS, R. (1986). Steroid dynamics in the normal and carcinomatous mammary gland. *J Steroid Biochem* 25, 799-802.

VIHKO, R. & APTER, D. (1989). Endogenous steroids in the pathophysiology of breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 9, 1-16.

VON VOLKMANN, R. & BRUST, K. (1875). *Beitrage zur chirurgie, Breitkopf und Hartel*.

WEBSTER, J. D., DENNIS, M. M., DERVISIS, N., HELLER, J., BACON, N. J., BERGMAN, P. J., and others (2011). Recommended guidelines for the conduct and evaluation of prognostic studies in veterinary oncology. *Veterinary Pathology* 48, 7-18.

WILSON, J. & BALKWILL, F. (2002). The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin Cancer Biol* 12, 113-120.

WINGO, P. A., JAMISON, P. M., YOUNG, J. L. & GARGIULLO, P. (2004). Population-based statistics for women diagnosed with inflammatory breast cancer (United States). *Cancer Causes Control* 15, 321-328.

WOOD, C. E., USBORNE, A. L., STAROST, M. F., TARARA, R. P., HILL, L. R., WILKINSON, L. M., GEISINGER, K. R., FEISTE, E. A. & CLINE, J. M. (2006). Hyperplastic and neoplastic lesions of the mammary gland in macaques. *Vet Pathol* 43, 471-483.

WU, V. S., KANAYA, N., LO, C., MORTIMER, J. & CHEN, S. (2015). From bench to bedside: What do we know about hormone receptor-positive and human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 153, 45-53.

YAMASHITA, A., MARUO, K., SUZUKI, K., SHIROTA, K., KOBAYASHI, K. & HIOKI, K. (2001). Experimental chemotherapy against canine mammary cancer xenograft in SCID mice and its prediction of clinical effect. *J Vet Med Sci* 63, 831-836.

YANG, W. Y., LIU, C. H., CHANG, C. J., LEE, C. C., CHANG, K. J. & LIN, C. T. (2006). Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. *J Comp Pathol* 134, 70-79.

- YUE, W., SANTEN, R. J., WANG, J. P., HAMILTON, C. J. & DEMERS, L. M. (1999). Aromatase within the breast. *Endocr Relat Cancer* 6, 157-164.
- ZELL, J. A., TSANG, W. Y., TAYLOR, T. H., MEHTA, R. S. & ANTON-CULVER, H. (2009). Prognostic impact of human epidermal growth factor-like receptor 2 and hormone receptor status in inflammatory breast cancer (IBC): analysis of 2,014 IBC patient cases from the California Cancer Registry. *Breast cancer research : BCR* 11, R9.
- ZIEKMAN, P. G., OTTER, W. D., TAN, J. F., TESKE, E., KIRPENSTEIJN, J., KOTEN, J. W. & JACOBS, J. J. (2013). Intratumoural interleukin-2 therapy can induce regression of non-resectable mastocytoma in dogs. *Anticancer research* 33, 161-165.
- ZLOTNIK, A. & YOSHIE, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127.
- ZUCCARI, D. A., CASTRO, R., GELALETI, G. B. & MANCINI, U. M. (2011). Interleukin-8 expression associated with canine mammary tumors. *Genet Mol Res* 10, 1522-1532.

ANEXOS

ANEXO I

Prognostic Value of Histological Grading in Noninflammatory Canine Mammary Carcinomas in a Prospective Study With Two-Year Follow-Up: Relationship With Clinical and Histological Characteristics

Peña, L.; de Andrés, P.J.; Clemente, M.; Cuesta, P.; and Pérez-Alenza, M.D.

Veterinary Pathology 50(1) 94-105, 2012

Prognostic Value of Histological Grading in Noninflammatory Canine Mammary Carcinomas in a Prospective Study With Two-Year Follow-Up: Relationship With Clinical and Histological Characteristics

L. Peña^{1,2}, P. J. De Andrés^{1,2}, M. Clemente^{1,3}, P. Cuesta⁴, and M. D. Pérez-Alenza^{1,3}

Veterinary Pathology
50(1) 94-105
© The Author(s) 2012
Reprints and permission:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0300985812447830
vet.sagepub.com



Abstract

In this prospective study, a canine-adapted histological grading method was compared with histopathological and clinical characteristics and was evaluated as a prognostic indicator in canine mammary carcinomas (CMCs). Recruited dogs with at least 1 malignant mammary tumor ($n = 65$) were clinically evaluated, surgically treated, and followed up (minimum follow-up 28 months, maximum 38 months). Histopathological diagnoses were performed according to Goldschmidt et al (2011). Tumors were graded as grade I (29/65), grade II (19/65), and grade III (17/65). The tumor size, clinical stage, histological diagnosis, presence/absence of myoepithelial proliferation, and regional lymph node metastases at diagnosis were significantly associated with histological grade. The histological grade, age, clinical stage, tumor subtype group, and lymph node metastases at time of diagnosis were significantly associated with the development of recurrences and/or metastases, cancer-associated death, and survival times (disease-free survival and overall survival) in univariate analyses. A subdivision of clinical stage I (T1N0M0) into stages IA and IB was proposed in terms of prognosis. The clinical stage, histological grade, and spay status were selected as independent prognostic variables (multivariate analyses) with disease-free survival as the dependent variable. When overall survival was evaluated as a dependent variable, clinical stage and histological grade were selected as the independent covariates. This grading system is a useful prognostic tool, facilitates histological interpretation, and offers uniform criteria for veterinary pathologists. Comparative studies on CMCs performed in different countries should take into account possible changes in the prognoses due to different proportions of spayed females among the selected dog population.

Keywords

dogs, mammary carcinomas, histological grading, prognosis, prospective study, multivariate analyses, follow-up, survival

Histological diversity of canine mammary tumors makes their diagnosis difficult and provides little prognostic information. The use of a histological grading system may be helpful for classification and prognosis. In canine mammary carcinomas (CMCs), the degree of infiltration¹² has been used and has been found to be of prognostic significance.^{34,35} Several histological malignancy grading systems have been proposed for human breast cancer to simplify the information provided by the pathologist to the clinician and to make this information more accurate.^{13,38} Among these grading systems, the most prevalent system used worldwide is the Elston and Ellis numeric method for grading human breast cancer; this method is also known as the Nottingham method.⁷ This grading system is based on the assessment of the following 3 morphological features: tubule formation, nuclear pleomorphism, and mitotic counts. Each of these features is scored from 1 to 3, and this grading system is mostly directed at invasive (simple) adenocarcinomas. In

recent years, this grading system has been used to study CMCs.^{6,8-11,16,18,20-22,27,31-33} Three of these studies^{18,25,27} evaluated the prognostic significance of this human method demonstrating its predictive value in univariate analyses.^{18,27}

¹ Department of Animal Medicine, Surgery and Pathology, Complutense University of Madrid, Spain

² Pathology Service, Complutense University of Madrid, Spain

³ Oncology Service, Veterinary Teaching Hospital, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Spain

⁴ Computer Service Support for Teaching and Research, Complutense University of Madrid, Spain

Corresponding Author:

Laura Peña, Department of Animal Medicine, Surgery and Pathology, Veterinary School, Carretera de la Coruña s/n. Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain.

Email: laurape@vet.ucm.es

ANEXO II

Canine Mammary Cancer as a Model for Human Breast Cancer: Hormonal Homologies and Differences

de Andrés, P.J.; Cáceres, S.; Illera, J.C.; Queiroga, F.L.; Illera, M.J.; Vidart, J.A.;
Moreno, M.A.; Román, J.M.; Pérez-Alenza, M.D. and Peña, L.

Enviado a American Journal of Translational Research, 2015

CANINE MAMMARY CANCER AS A MODEL FOR HUMAN BREAST CANCER: HORMONAL HOMOLOGIES AND DIFFERENCES.

Paloma J. de Andrés¹ DVM; Sara Cáceres² BSC; Juan C. Illera² DVM, PhD, DiplECAR; Felisbina L. Queiroga^{3,4} DVM, PhD; Maria J. Illera² DVM, PhD; José A. Vidart⁵ MD, PhD; Arantxa Moreno⁵ MD, PhD; Jose M. Román⁵ MD, PhD; M. Dolores Pérez-Alenza¹ DVM, PhD and Laura Peña¹ DVM, PhD, DiplECVP.

¹Dept. Animal Medicine, Surgery and Pathology; Veterinary School. Complutense University of Madrid, Avda Puerta de Hierro s/n, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, Spain.

²Dept. Animal Physiology. Veterinary School. Complutense University of Madrid, Avda Puerta de Hierro s/n, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, Spain.

³Department of Veterinary Sciences, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal.

⁴Center for Research and Technology of Agro-Environment and Biological Sciences (CITAB), University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal.

⁵Gynaecology Department. Hospital Clínico San Carlos. Calle Profesor Martín Lagos, S/N, 28040 Madrid, Spain.

Running Title: Hormonal comparison of human and canine breast cancer

Author for correspondence: Laura Peña. E-mail: laurape@ucm.es. Dept. Animal Medicine, Surgery and Pathology; Veterinary School. Complutense University of Madrid, Avda Puerta de Hierro s/n, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, Spain.

Acknowledgements

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Education (research project N° SAF 2009-10572 and PhD fellowship). We are grateful to Pedro Aranda for his histological technical assistance.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Abstract

Spontaneous canine mammary cancer (CMC) has been proposed as a natural model for the study of human breast cancer (HBC). Nevertheless, there are no previous studies comparing tumor hormonal status in both species. The aims of this study were to investigate the immunohistochemical expression of Aromatase and steroid receptors and the intratumor steroid hormone levels of 17 β -estradiol (E2), estrone sulphate (SO4E1), progesterone (P4), androstenedione (A4), dehydroepiandrosterone (DHEA), and testosterone (T) in 78 samples of mammary cancer [13 premenopausal (PM- HBC), 38 menopausal (M-HBC) and 27 CMC] and the corresponding controls. Arom immunostaining was similar between HBC and CMC. ER α immunoexpression was more frequent in HBC, ER β immunostaining was similar in the two species and the scores for PR and AR immunostaining were lower in the CMC. Tumor concentrations of estrogens, progesterone and androgens were increased in HBCs and CMCs respect to their control tissues. Statistical associations among aromatase, receptors and hormones analyzed differed in the human and canine species, suggesting possible different carcinogenetic mechanisms. CMCs had a higher frequency of ER α -/RP+ tumors compared to HBCs. In HBC PR expression was associated with ER α ($p < 0.001$) whereas in CMC RP immunoexpression was associated with ER β . Arom immunoexpression was significantly associated with ER α immunolabeling in HBCs ($p = 0.015$) and with ER β immunolabeling in CMCs ($p = 0.031$). The possible distinct role of ER β in CMC requires further investigation. Comparative studies using canine mammary cancer as a model for human breast cancer should take into account these hormonal similarities and differences between both species.

Keywords: canine mammary cancer, breast cancer, aromatase, steroid receptors, animal model, steroid hormones

Introduction

Human breast cancer (HBC) and canine mammary cancer (CMC) represent common neoplastic diseases that are still an important cause of mortality in women [1, 2] and female dogs [3-6]. CMC is a spontaneous cancer that has been proposed as a model for the study of HBC [7-12]; though, most of the comparable aspects, including the hormonal profile, have not been evaluated yet.

Several differential characteristics on the canine mammary cancer respect to human breast cancer should be considered. Among them, a high proportion of tumors with myoepithelial proliferation, a high frequency of mixed neoplasms [13] and the absence of menopausal status in the female dog are relevant. Differences regarding estral cycle should be also contemplated: healthy female dogs only present one or two estrus per year, which represents a low estrogenic influence compared to women [14]. If this hormonal variation in estral cycle between both species may be reflected on the local hormonal status and receptors of the mammary tumors remains obscure. The expression of estrogen receptor α (ER α) and progesterone receptor (PR) in canine mammary tumors has been postulated as one important characteristic to support the use of the canine model [7-10, 15-19]. ER α and PR are routinely determined in HBC for prognostic and therapeutic purposes but not in CMC, where the detection of ER α and PR is restricted to research. Several publications have demonstrated their expression in CMC, mostly in low malignant tumors and, in some cases, a relation to prognosis has been indicated [15-17, 20-26]. ER β expression in HBC [27-31] and CMC [21, 25, 32] is poorly known and still controversial. ER β is highly expressed in human normal breast tissue [27, 30, 33, 34] and canine normal mammary glands [21, 32]. Even less studied is the expression of the androgen receptor (AR) in breast cancer, although in the last years, the research on AR expression has been increased for its prognostic value [35-37] and as a potential therapeutic target for triple negative breast cancer [38-45].

Little is known about AR in CMC; the only published study indicates a high prevalence of AR positive tumors (85%) [21]. All these steroid receptors can act triggering the growth action of their corresponding binding hormones that can be secreted locally. It is widely accepted that the mammary gland is a peripheral site for the production of steroid hormones [46]. The enzymes responsible for the synthesis of androgens, estrogens and progestagens have been detected in normal and neoplastic mammary gland of several animals including rats [47], goats [48], cows [49], dogs [11, 50-52] and humans [53-55]. Among them, the expression of the enzyme cytochrome P450-Aromatase (Arom, Cyp19a1, which catalyzes the conversion of androgens to estrogens *in situ*), has been analyzed in several studies in HBC [56-59] where the immunoreactivity of the enzyme is associated with its activity [57] and the immunoexpression of the ER α [56]. There is very little information regarding Arom in normal or neoplastic canine mammary gland [51, 52].

The content of intratumor steroid hormones has been little studied in HBC [60-66] and in CMC [19, 21, 67]. The biological significance of *in situ* estrogen production with regard to the development and biological behavior of breast cancer still remains controversial. Most studies indicate that intratumor estrogens derived from *in situ* aromatization could stimulate autocrine growth and could function as mitogenic factors; therefore, these hormones might impart a growth advantage to the cancer cells, independently of estrogens serum concentrations [68-70]. Although less studied, normal and neoplastic human breast tissues contain and produce also several forms of androgens [61-63]. The few studies published on canine mammary neoplasms indicate that intratumor steroid hormones are increased with malignancy [19, 21, 67].

In order to know the validity of canine mammary cancer as a model for human breast cancer from a hormonal point of view, the aims of this study were to compare the immunohistochemical expression of Arom and several hormone receptors (ER α , ER β ,

PR and AR), to analyze the intratumor steroid hormone concentrations (17β -estradiol, estrone sulphate, progesterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone, and testosterone), and to study possible associations among these markers using HBC and CMC samples.

Materials and Methods

Sampling

Human breast samples

During one year, fresh surgical breast samples of women with breast cancer clinically examined and treated in the Hospital Clínico San Carlos were prospectively collected before chemotherapy, hormonotherapy or radiotherapy. Clinical data (age of the patient, menopausal status, clinical staging, size, and lymph node status) were recorded. Patients were considered menopausal when they reported not having any menses over the past 12 months. In total, 51 surgical HBC fresh samples from patients with a mean age of 63.3 years (range 33-89 years, 13 pre-menopausal and 38 menopausal) were prospectively collected.

Additionally, fresh normal human control (HC) breast samples from ten adult healthy women [6 pre-menopausal and 4 menopausal voluntary donors], without a history of breast or endocrine disorders and not using any hormone therapy were obtained. These patients had undergone surgical reduction mammoplasties (aged range: 23 to 65 years, mean 43.4 years).

This study was conducted with the understanding and consent of every patient included and with the approval of the Ethical Committee of the Hospital Clínico San Carlos.

Canine mammary samples

During the same year, fresh surgical samples of 27 female dogs that presented at the Complutense University Veterinary Clinic Hospital with mammary cancer (CMC) and that followed the clinical protocol established were obtained prior to chemotherapy, hormonotherapy or radiotherapy. Clinical information included: age, ovariectomy status, clinical staging, tumor size, and lymph node status. The animals were of different

breeds, with a mean age of 10.2 years (6–14 years). Fresh canine control mammary tissues (CC) were obtained by punch biopsies from 8 adult healthy female beagle dogs from a colony (ages 6–10 years), without a history of mammary or endocrine disorders. In this study, all the steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment. The study was performed under consent of every owner and with the approval of the Animal Research Ethics Committee of the Complutense University of Madrid.

Sampling processing

All mammary samples (51 HBC, 10 HC, 27 CMC, 8CC) were divided into 2 adjacent fragments, one portion was fixed in neutral formalin for histopathology and immunohistochemistry, and the other one was frozen (-80°C) and stored until hormone determinations.

Histopathology and immunohistochemistry

Formalin tissue samples were embedded in paraffin, cut into 3 µm sections and stained with hematoxylin-eosin. The histopathological diagnoses were done using the WHO's classification system for HBC [71] and the last classification for CMC [13]. The histological grading was established using the Elston and Ellis' system in human breast samples [72] and a similar system adapted for canine mammary cancer in the CMC group [73].

Immunohistochemical detection of Aro, ER α , ER β , PR and AR was performed in all mammary samples using antibodies with known reactivity in both species and following the same methodology.

Immunohistochemistry of Arom was performed as follows: paraffin sections were placed in a PT module (Lab Vision) containing an EDTA buffer solution (pH 8.0) (MAD-004072R/D, Master Diagnostica), heated for 20 minutes at 95°C and cooled down to 60°C. After this high temperature antigen retrieval protocol, slides were rinsed out in warm tap water and placed in an automatic immunostainer device (Lab Vision Corporation) for immunohistochemistry using a peroxidase detection system kit (MAD-021881QK, UltraVision Quanto-HRP). For the incubation with the primary antibody (ab35604, Abcam, 1/50, with known reactivity to canine Arom) the slides were placed in a wet chamber at 4°C overnight. After immunostaining, the slides were hematoxylin counterstained and permanently mounted with Depex. Corresponding negative control slides were done by replacing the primary antibody with a non-reactive antibody. Human placenta and canine ovary slides were used as positive controls.

For hormone receptors, immunohistochemistry was performed on dewaxed sections using the streptavidin-biotin-complex peroxidase method. After a high temperature antigen unmasking protocol (boiling slides in a pressure cooker for 2 min in buffer citrate, pH 6), endogenous peroxidase was blocked by immersion in 0.3% hydrogen peroxide for 15 minutes. Primary antibodies used were: mouse monoclonal anti-ER α (C-311 Santa Cruz Biotechnology, 1/20), rabbit polyclonal anti-ER β (06-629 Upstate, 1/200), mouse monoclonal anti-PR (1A6, Novocastra, 1/40) and rabbit polyclonal anti-AR (N-Ab-2, Thermo Scientific, 1/25). All primary antibodies were incubated at 4°C overnight. Secondary antibody for ER α , and PR was horse anti-mouse IgG (Vector BA2000, diluted 1/400), for ER β was goat anti-rabbit (E0432 Dako, 1/300) and for AR was swine anti-rabbit (E0353 Dako, 1/200). All the secondary antibodies were incubated at room temperature 1 hour. After the secondary antibody, all the slides were subsequently incubated with streptavidin conjugated with peroxidase (1:400, 30

minutes at room temperature; No. 43-4323, Zymed, San Francisco, CA). All washes and dilutions were made in Tris-Buffered Saline (0.1M Tris base, 0.9% NaCl, pH 7.4). The slides were developed with a chromogen solution containing 25 g of 3-30 diaminobenzidine tetrachloride (No. D5059, Sigma, St. Louis, MO), counterstained in hematoxylin (No. GH5-2-16, Sigma), washed in tap water, dehydrated, cleared in xylene, and mounted. Corresponding negative control slides were obtained by replacing the primary antibody with a non reacting antibody on human or canine tissues. The positive controls included were: normal canine uterus used as a positive control for ER α , ER β and PR; in CMCs, adjacent hyperplastic tissue was used as additional internal positive controls for these receptors, when available. For AR, normal canine prostate was used as a positive control. When present, normal dermal sebaceous glands were used as additional internal positive controls for AR immunostaining.

Following the Allred score system [74], immunohistochemistry results of Arom (cytoplasmic immunolabeling) and hormone receptors (nuclear immunolabeling) were expressed as a Total Score (TS), calculated as the sum of the percentage of positive cells (PS) and the intensity of immunolabeling (IS). A sample was considered positive for Arom and hormone receptors when TS>3.

Assessment of steroid concentrations in tumor homogenate samples

The analyses were performed according to previously published protocols [19, 21]. After defreezing, 0.5 g of the normal and neoplastic tissues were homogenized in 4ml of PBS (pH 7.2) and centrifuged (3500 rpm, at 4 °C for 20 min). The supernatants were collected and aliquoted individually (−30 °C), until hormone assays.

17 β -estradiol (E2), estrone sulphate (SO4E1), progesterone (P4), androstenedione (A4), dehydroepiandrosterone (DHEA), and testosterone (T) levels of

normal and neoplastic breast and mammary tissue homogenates were assayed by competitive EIA previously validated in our laboratory. Homogenate samples were prepared by diluting 10 µl of each homogenate in an assay buffer (1:2500 for DHEA, A4, T and SO4E1 or 1:500 for E2), and then extracted with 2ml of diethyl ether (Sigma Co., St. Louis, MO, USA). One hundred microlitres of the supernatant were evaporated under a nitrogen stream (Turbovap, ZIMARK, Hopkinton, MA, USA).

17 β-Estradiol concentrations in tissue homogenates were expressed in pg/g. Levels of SO4E1, P4, A4, DHEA and T in tissue homogenates were expressed in ng/g.

Statistical analysis

Analyses were performed by the statistical software IBM SPSS version 19 (SPSS Inc., Chicago, USA) and a conventional $p < 0.05$ level was used to define statistical significance.

For the comparisons, three groups were established: premenopausal women (PM-HBC), menopausal women (M-HBC) and dogs (CMC). The categorical variables analyzed and the categories established were as follows: menopausal status in the women (premenopausal/menopausal), histological malignancy grade (I/II/III), Arom and steroid receptors (negative/positive). Pearson chi-squared statistic analysis was used to test the association among the different categorical variables within the groups. The numerical variables Allred TS (mean \pm S.E) [74] and steroid concentrations (E2, SO4E1, P4, A4, DHEA and T) (mean \pm S.E) were analyzed for their correlations (bivariate Pearson correlation test) and to find associations with the categorical variables (T tests).

Results

Histopathology

Histopathology of human and canine samples revealed several histologic subtypes of carcinomas. The HBCs were diagnosed as follows: invasive ductal carcinomas (n=38), mucinous carcinomas (n=5), invasive lobular carcinomas (n=4), invasive papillary carcinomas (n=2), and tubular carcinomas (n=2). CMCs were diagnosed as follows: tubular carcinoma (n = 7), tubulopapillary carcinoma (n = 5), solid carcinoma (n = 5), complex carcinoma (n= 3), mixed type carcinoma (n = 3), adenosquamous carcinoma (n=2), lipid-rich carcinoma (n=1) and anaplastic carcinoma (n = 1).

Immunoexpression of Arom, ER α , ER β , PR and AR

Human breast and canine mammary controls were positive for all markers studied.

Immunolabeling of Arom was cytoplasmic in the neoplastic epithelial cells and heterogeneous within the same tumor section in both HBCs and CMCs. In the normal breast/mammary glands, Arom immunolabeling was weak and homogeneous. The rest of the markers studied (ER α , ER β , PR and AR) presented a nuclear immunolabeling with variable heterogeneity; the heterogeneity of immunostaining across the same section was more evident in ER α and PR, and in CMC samples.

The immunoexpression of Arom and steroid receptors (ER α , ER β , PR and AR) in the three groups studied (PM-HBC, M-HBC and CMC) is shown in Fig. 1 and summarized in Table 1. In the HBC group, Arom+ tumors were more frequent in the menopausal group, although this association didn't reach the statistical significance

level ($p=0.15$) (86.8% Arom+ in M-HBC *vs.* 69.2% of PM-HBC; 13.2% of Arom- in M-HBC *vs.* 30.8% of Arom- in PM-HBC). Arom immunolabeling was similar in HBC respect to CMC. All steroid receptors were more expressed in HBC than in CMC. The most striking difference was the higher immunoexpression of ER α (TS, $p < 0.001$; % of positive cells, $p = 0.002$) in M-HBC respect to CMC.

Steroids concentrations in tumor homogenate samples

Steroid hormones concentrations in tumor homogenates are depicted in Table 2.

Hormone tissue levels of E2, SO4E1, P4, A4 and T were significantly higher in malignant samples than in compared normal breast/mammary samples in all the groups studied (PM-HBC, M-HBC, and CMC). Levels of DHEA were also higher in all groups, although the values did not reach the significant level in the PM-HBC group.

Statistical associations among the markers studied

Arom associations

In HBC tumors, Arom (-/+) immunoexpression was significantly associated to high ER α immunolabeling (TS and -/+) and AR (TS) as follows: 85.4% (35/41) of Arom+ tumors were ER α + ($p = 0.015$); AR immunoexpression in Arom+ tumors was lower than in Arom- tumors (AR TS 6.44 ± 0.20 in Arom+ tumors *vs.* 7.60 ± 0.31 in Arom- tumors; $p = 0.005$). Besides, there was a positive statistical association among Arom (-/+) and DHEA (Arom+ tumors had higher levels of tissue DHEA than Arom- tumors; $p = 0.016$). In the premenopausal group, there was a statistical significant association between Arom (-/+) and tumor SO4E1 as follows: in the Arom+ samples the

mean of intratumor SO4E1 was higher than the mean of intratumor SO4E1 of the Arom- samples ($p = 0.021$). In the menopausal group, Pearson's correlation was negative between Arom and AR TS ($p = 0.036$).

In the CMC group, Arom (-/+) was significantly associated with ER β immunoexpression (-/+) (94.7%, 18/19, of Arom+ tumors were also ER β +) ($p = 0.031$), and with PR (-/+) (94.7%, 18/19, of Arom+ tumors were PR+, whereas 75% (3/4) of the PR- tumors were Arom- ($p = 0.031$). Also, Arom and ER β TS were positively correlated ($p = 0.018$).

Steroid receptors associations

In the HBC here was a strong positive association between ER α immunoexpression (TS and -/+) and the PR immunoexpression (TS and -/+) (p values < 0.001). There was also a positive association between ER β (TS and -/+) and AR (TS) ($p < 0.001$ and $p = 0.003$ respectively). On the other hand, ER β (TS) was inversely associated with many hormonal contents as follows: P4 ($p = 0.024$), E2 ($p = 0.032$) and SO4E1 ($p = 0.002$). This negative association was also observed among AR (TS) and tissue contents of E2 and SO4E1 (p values < 0.001). Considering only PM-HBC, ER α and PR were also positively associated (TS, $p = 0.010$). Also in this group, PR+ tumors had lower content of T than PR- tumors ($p = 0.020$). Similarly, there was a positive association between ER α and PR in the M-HBC group. This group also showed a strong positive correlation between ER β and AR ($p < 0.001$). Additionally, not only the ER β but also the AR, were negatively associated with the tumor content of SO4E1 ($p = 0.007$ and $p = 0.042$, respectively).

In CMC group, several markers were positively associated: ER α / AR ($p = 0.038$), ER β / PR ($p = 0.002$) and ER β /AR ($p = 0.036$). Besides, the expression of several hormone receptors was negatively associated with hormones in the tumor homogenates: ER α / T ($p = 0.022$), ER α /DHEA ($p = 0.014$), ER β / T ($p = 0.022$), and PR/ SO4E1 ($p = 0.005$) and PR/T ($p = 0.034$). Other finding was that AR- tumors contained more A4 than AR+ tumors ($p = 0.002$).

Associations among the different hormonal tissue concentrations

Regarding the correlations among the tumor hormone concentrations, there was a positive correlation T/DHEA in PM-HBC group ($p = 0.032$). In CMC, T concentration was positively correlated with SO4E1 ($p < 0.001$) and A4 ($p = 0.007$). Also in CMC group A4 was positively correlated with DHEA ($p = 0.017$).

The similarities and differences between human breast cancer and canine mammary cancer with the different markers analyzed are summarized in Table 3.

Discussion

Female dogs with mammary cancer have been proposed as a spontaneous natural model for breast cancer, being especially useful in studies on new therapeutic approaches [7, 9-11, 75, 76]; nevertheless, some differences between the tumors of the two species must be taken into consideration to make any comparison feasible. Most of the previous studies indicating the dog as an animal model for breast cancer have not made a proper comparison using samples of the both species to verify the similarities between both types of cancers using the same methodology. An exception is the study of Uva et al. (2009) that analyzed the gene expression of both CMC and HBC and normal mammary samples finding a great degree of similarity in the perturbation of many cancer-related pathways [75]. In the present study, to assess the extent to which the canine mammary tumors and human breast cancers are comparable in terms of hormonal background, the immunohistochemical expression of Arom and steroid receptors ($ER\alpha$, $ER\beta$, PR and AR) and the hormonal (E2, SO4E1, P4, A4, DHEA and T) content in a series of tumors of both species, as well as the existing associations between them are compared for the first time. According to the literature, tumor content of steroid hormones in HBCs or CMCs is poorly studied, therefore, the present study is also important for the hormonal pathogenesis of the breast/mammary cancer in both species separately. Starting from the comparison between the CMC and the HBC, the analysis was divided to explore the similarities between the dog and the premenopausal women (PM-HBC) or menopausal women (M-HBC), given the differences in the estral cycles in these three groups. Shifting the focus from a general comparison to a detailed comparison of the immunohistochemical expression of Arom and the hormonal receptors studied, there is an evidence for a closer similarity between CMC and PM-HBC. Regarding the intratumor hormonal content, the three groups of malignancy showed similar increases compared to the normal breast/mammary tissues.

The comparison of the immunohistochemical expression of steroid receptors between the two species has never been investigated. The immunoexpression of the receptors in both species is similar to previous results published separately [20-23, 32, 77-80]. In general, the human samples showed higher immunoexpression of the hormonal receptors studied; the percentages of positive tumors to most hormonal receptors and Arom are similar when comparing CMC with the PM-HBC.

The higher immunoexpression of ER α (TS and -/+) in M-HBC is the major difference observed between HBCs and CMCs. In the HBC group, ER α was positively associated to Arom, as it had been previously observed [56]. Moreover, in the human samples, we observed a negative association between ER β and tumor content of E2 and SO4E1. These results may support the main action of the E2 via ER α in HBC. On the contrary, in CMC, given the low proportion of ER α + tumors and the higher percentage of ER β + tumors (85.2% ER β + vs 48.1% ER α + in CMC), and that E2 levels increased in the CMC samples compared to the CC, E2 could act mainly through the ER β in the mammary gland carcinogenesis in the canine species as it has been suggested previously [21]. Moreover, in the canine samples there was a higher frequency of ER α -/RP+ tumors compared to the HBCs (44.4% in CMC vs. 16.6% in PM-HBC and 7.9% in M-HBC). Other important results that may support these hypotheses are: the positive association between ER α and PR found in the human samples, being this result in agreement with previous data [81, 82]; but on the contrary, in the canine samples the positive association was found between PR and ER β . However, there are few studies on the expression of ER β in HBC [27-31] and in CMC [21, 32], therefore the possible distinct role of ER β requires further investigation.

In spite of similar percentages of PR+ and AR+ tumors, the TS obtained in both species show higher immunoexpression of these receptors in the human samples. In the M-HBC group, PR (TS) and AR (TS) were significantly increased with respect to CMC

($p = 0,003$ and $p < 0,001$, respectively) and in PM-HBC group only RA (TS) was significantly increased ($p = 0.001$). Future studies should focus on this finding but, in the meantime, these results should be taken into account for potential comparative studies between HBC and CMC. On the other hand, in the canine samples, the content of A4 in AR+ tumors was lower than the content of A4 in the AR-tumors, thus, it seems reasonable that A4 level decreases when the AR is present due to the conversion of A4 to T, which binds to AR.

Sex steroid formation in peripheral tissues is well documented in humans, the cytochrome P450-Aromatase (Cyp19a1) is an enzyme widely investigated in HBC [56, 59, 69, 83-86]; unfortunately, there is a paucity of information regarding aromatase in CMC. An expected finding of our study is the association between tumor expression of Arom and the menopausal status in HBC. This could be in relation with the role of the mammary gland (normal or neoplastic) as a peripheral source of estrogens, especially in postmenopausal women [87].

Aromatase immunoexpression in the neoplastic cells was similar in both species and it was associated with ER α status in HBC, association observed previously by others [56, 88] and with ER β in CMC. In HBC, tumors that showed immunoreaction to Arom were mainly ER α + but showed low countings of AR TS, suggesting that when Arom is present, the local conversion of T to E2 could upregulate the ER α , and consequently downregulate the expression of AR. Similarly, in CMC, Arom+ tumors were also positive to ER, but in this species to the isoform β , again supporting the hypothesis of a major role of ER β in the mammary carcinogenesis of the canine species. Also in CMC, Arom was not inversely associated with AR but with PR as most of the Arom+ tumors were PR+. A difference between species regarding the influence of progestagens should be taken into consideration, since the canine species is under a major influence of the progestagens due to a longer time period between consecutive

estral cycles in the female dog. The influence of progestagens in the mammary carcinogenesis of the dog has been previously indicated [89-91].

With respect to the hormonal tissue content, HBCs and CMCs contained higher amounts of all the hormones assayed compared with the respective normal control tissues of each species. These results are in agreement with previous studies in HBC [61, 68-70] and CMC [19, 21]. Nevertheless, when comparing the hormone concentrations in the tumors of the human and canine species (Table 2) is evident that estrogens (E2 and SOE1) and P4 levels are higher in the HBCs than in CMCs, while the concentrations of androgens (A4, DHEA and T) in both species are quite similar.

Another interesting difference between both species is the dramatic increase of T observed in the CMC samples respect to the controls (CC) (44 times higher). Considering that there was a 2 points difference in the AR TS between both species, being AR more frequent in human samples with respect to canine samples, the role of the testosterone in canine mammary carcinogenesis still remains obscure. In the human samples, the hormone with a major increase was A4 for both premenopausal and postmenopausal HBC (between 12-16 times higher).

Summarizing the findings of the present study, Arom immunostaining was similar between HBCs and CMC. There are differences in the ER α immunoexpression, being ER α more frequent in the HBCs. ER β immunostaining was similar between the three groups of malignancy, but, due to the low prevalence of ER α in the CMC, ER β seems to be very important at least, in the canine species. PR and AR positive cases were similar in both species, however the TS of the AR and PR in the canine samples were lower compared to the HBCs. Estrogens, progesterone and androgens levels were increased HBCs and CMCs respect to their control tissues, but different associations were found between the hormones within the three groups studied, indicating possible different pathogenic mechanisms. The intratumor levels of estrogens and progesterone

are much higher in the HBC samples than in CMC samples; nevertheless intratumor androgen levels are comparable between the two species. Future studies about the production and metabolism of steroid hormones in CMC and HBC would be desirable to know the comparative role of these hormones and to assure the use of canine mammary cancer as a good animal model for the study of human breast cancer.

Conclusion

Several similarities and differences have been found between CMC and HBC from a hormonal point of view, which indicates that comparison studies between both species should take into account these hormonal differences.

Acknowledgements

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Education (research project N° SAF 2009-10572 and PhD fellowship). We are grateful to Pedro Aranda for his histological technical assistance.

References

- [1] Boyle P and Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16: 481-488.
- [2] Du XL, Fox EE and Lai D. Competing causes of death for women with breast cancer and change over time from 1975 to 2003. *Am J Clin Oncol* 2008; 31: 105-116.
- [3] Dorn CR, Taylor DO, Schneider R, Hibbard HH and Klauber MR. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst* 1968; 40: 307-318.
- [4] Schneider R, Dorn CR and Taylor DO. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst* 1969; 43: 1249-1261.
- [5] Clemente M, Perez-Alenza MD and Pena L. Metastasis of canine inflammatory versus non-inflammatory mammary tumours. *J Comp Pathol* 2010; 143: 157-163.
- [6] Misdorp W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten DJ, editors. *Tumors in domestic animals*. Wiley-Blackwell; 2002. p. 575-588.
- [7] MacEwen EG. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 9: 125-136.
- [8] Knapp DW and Waters DJ. Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. *Mol Med Today* 1997; 3: 8-11.
- [9] Vail DM and MacEwen EG. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest* 2000; 18: 781-792.

- [10] Antuofermo E, Miller MA, Pirino S, Xie J, Badve S and Mohammed SI. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs--a model of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 2247-2256.
- [11] Peña L, Pérez-Alenza MD, Rodríguez-Bertos A and Nieto A. Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 78: 141-148.
- [12] Liu D, Xiong H, Ellis AE, Northrup NC, Rodriguez CO, Jr., O'Regan RM, Dalton S and Zhao S. Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. *Cancer Res* 2014; 74: 5045-5056.
- [13] Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R and Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol* 2011; 48: 117-131.
- [14] Feldman EC and Nelson RW. Canine and feline endocrinology and reproduction. St. Louis, Mo. ; [Great Britain]: W.B. Saunders, 2004.
- [15] Kim NH, Lim HY, Im KS, Shin JI, Kim HW and Sur JH. Evaluation of clinicopathological characteristics and oestrogen receptor gene expression in oestrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *J Comp Pathol* 2014; 151: 42-50.
- [16] Mainenti M, Rasotto R, Carnier P and Zappulli V. Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. *Vet J* 2014; 202: 62-68.
- [17] Gama A, Alves A and Schmitt F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch* 2008; 453: 123-132.

- [18] Yang WY, Liu CH, Chang CJ, Lee CC, Chang KJ and Lin CT. Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. *J Comp Pathol* 2006; 134: 70-79.
- [19] Peña L, Silván G, Pérez-Alenza MD, Nieto A and Illera JC. Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 84: 211-216.
- [20] Nieto A, Peña L, Pérez-Alenza MD, Sánchez MA, Flores JM and Castaño M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 2000; 37: 239-247.
- [21] Illera JC, Pérez-Alenza MD, Nieto A, Jiménez MA, Silván G, Dunner S and Peña L. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids* 2006; 71: 541-548.
- [22] Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V and Goldschmidt MH. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol* 2011; 48: 85-97.
- [23] de Las Mulas JM, Millán Y and Dios R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol* 2005; 42: 200-212.
- [24] Millanta F, Calandrella M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I and Poli A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res Vet Sci* 2005; 79: 225-232.
- [25] Port Louis LR, Varshney KC and Nair MG. An immunohistochemical study on the expression of sex steroid receptors in canine mammary tumors. *ISRN Vet Sci* 2012; 2012: 378607.

- [26] Kumaraguruparan R, Prathiba D and Nagini S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res Vet Sci* 2006; 81: 218-224.
- [27] Reese JM, Suman VJ, Subramaniam M, Wu X, Negron V, Gingery A, Pitel KS, Shah SS, Cunliffe HE, McCullough AE, Pockaj BA, Couch FJ, Olson JE, Reynolds C, Lingle WL, Spelsberg TC, Goetz MP, Ingle JN and Hawse JR. ERbeta1: characterization, prognosis, and evaluation of treatment strategies in ERalpha-positive and -negative breast cancer. *BMC Cancer* 2014; 14: 749.
- [28] Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P and Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 2537-2541.
- [29] Skliris GP, Carder PJ, Lansdown MR and Speirs V. Immunohistochemical detection of ERbeta in breast cancer: towards more detailed receptor profiling? *Br J Cancer* 2001; 84: 1095-1098.
- [30] Jarvinen TA, Peltö-Huikko M, Holli K and Isola J. Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* 2000; 156: 29-35.
- [31] Mann S, Laucirica R, Carlson N, Younes PS, Ali N, Younes A, Li Y and Younes M. Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 2001; 32: 113-118.
- [32] Martín de las Mulas J, Ordás J, Millán MY, Chacón F, De Lara M, Espinosa de los Monteros A, Reymundo C and Jover A. Immunohistochemical expression of estrogen receptor beta in normal and tumoral canine mammary glands. *Vet Pathol* 2004; 41: 269-272.

- [33] Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P and Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer research* 2001; 61: 2537-2541.
- [34] Shaaban AM, O'Neill PA, Davies MP, Sibson R, West CR, Smith PH and Foster CS. Declining estrogen receptor-beta expression defines malignant progression of human breast neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1502-1512.
- [35] He J, Peng R, Yuan Z, Wang S, Peng J, Lin G, Jiang X and Qin T. Prognostic value of androgen receptor expression in operable triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. *Med Oncol* 2012; 29: 406-410.
- [36] Koo JS, Jung W and Jeong J. The predictive role of E-cadherin and androgen receptor on in vitro chemosensitivity in triple-negative breast Cancer. *Japanese journal of clinical oncology* 2009; 39: 560-568.
- [37] Pistelli M, Caramanti M, Biscotti T, Santinelli A, Pagliacci A, De Lisa M, Ballatore Z, Ridolfi F, Maccaroni E, Bracci R, Berardi R, Battelli N and Cascinu S. Androgen receptor expression in early triple-negative breast cancer: clinical significance and prognostic associations. *Cancers* 2014; 6: 1351-1362.
- [38] Gucalp A and Traina TA. Triple-negative breast cancer: role of the androgen receptor. *Cancer journal* 2010; 16: 62-65.
- [39] Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM, Pendleton CS, Tang L, Johnson KC, Chen X, Balko JM, Gomez H, Arteaga CL, Mills GB, Sanders ME and Pietenpol JA. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res* 2014; 16: 406.

- [40] Luo X, Shi YX, Li ZM and Jiang WQ. Expression and clinical significance of androgen receptor in triple negative breast cancer. Chinese journal of cancer 2010; 29: 585-590.
- [41] McGhan LJ, McCullough AE, Protheroe CA, Dueck AC, Lee JJ, Nunez-Nateras R, Castle EP, Gray RJ, Wasif N, Goetz MP, Hawse JR, Henry TJ, Barrett MT, Cunliffe HE and Pockaj BA. Androgen receptor-positive triple negative breast cancer: a unique breast cancer subtype. Ann Surg Oncol 2014; 21: 361-367.
- [42] McNamara KM, Yoda T, Takagi K, Miki Y, Suzuki T and Sasano H. Androgen receptor in triple negative breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol 2013; 133: 66-76.
- [43] Narayanan R, Ahn S, Cheney MD, Yepuru M, Miller DD, Steiner MS and Dalton JT. Selective androgen receptor modulators (SARMs) negatively regulate triple-negative breast cancer growth and epithelial:mesenchymal stem cell signaling. PLoS One 2014; 9: e103202.
- [44] Safarpour D and Tavassoli FA. A Targetable Androgen Receptor-Positive Breast Cancer Subtype Hidden Among the Triple-Negative Cancers. Arch Pathol Lab Med. 2014;
- [45] Shah PD, Gucaip A and Traina TA. The role of the androgen receptor in triple-negative breast cancer. Women's health 2013; 9: 351-360.
- [46] Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Belanger A, Simard J, Lin SX and Pelletier G. Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. Endocr Rev 2003; 24: 152-182.
- [47] Mori M, Tominaga T and Tamaoki BI. Steroid metabolism in normal mammary gland and in the dimethylbenzanthracene-induced mammary tumor of rats. Endocrinology 1978; 102: 1387-1397.

- [48] Slotin CA, Heap RB, Christiansen JM and Linzell JL. Synthesis of progesterone by the mammary gland of the goat. *Nature* 1970; 225: 385-386.
- [49] Belvedere P, Gabai G, Dalla Valle L, Accorsi P, Trivioletti M, Colombo L and Bono G. Occurrence of steroidogenic enzymes in the bovine mammary gland at different functional stages. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 59: 339-347.
- [50] Marinelli L, Gabai G, Wolfswinkel J and Mol JA. Mammary steroid metabolizing enzymes in relation to hyperplasia and tumorigenesis in the dog. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 92: 167-173.
- [51] d'Arville CN, Evans BA, Borthwick G and Pierrepont CG. Aspects of steroid metabolism in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch. *J Steroid Biochem* 1980; 13: 1407-1411.
- [52] Sanchez-Archidona AR, Jimenez MA, Perez-Alenza D, Silvan G, Illera JC, Pena L and Dunner S. Steroid pathway and oestrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 104: 93-99.
- [53] Miller WR, Telford J, Dixon JM and Shivas AA. Androgen metabolism and apocrine differentiation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1985; 5: 67-73.
- [54] Vihko R and Apter D. Endogenous steroids in the pathophysiology of breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 1989; 9: 1-16.
- [55] Honma N, Takubo K, Sawabe M, Arai T, Akiyama F, Sakamoto G, Utsumi T, Yoshimura N and Harada N. Estrogen-metabolizing enzymes in breast cancers from women over the age of 80 years. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 607-613.
- [56] Lykkesfeldt AE, Henriksen KL, Rasmussen BB, Sasano H, Evans DB, Moller S, Ejlersten B and Mouridsen HT. In situ aromatase expression in primary tumor is

associated with estrogen receptor expression but is not predictive of response to endocrine therapy in advanced breast cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 185.

- [57] Sasano H, Anderson TJ, Silverberg SG, Santen RJ, Conway M, Edwards DP, Krause A, Bhatnagar AS, Evans DB and Miller WR. The validation of new aromatase monoclonal antibodies for immunohistochemistry--a correlation with biochemical activities in 46 cases of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 95: 35-39.
- [58] Suzuki T, Moriya T, Ishida T, Ohuchi N and Sasano H. Intracrine mechanism of estrogen synthesis in breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2003; 57: 460-462.
- [59] Esteban JM, Warsi Z, Haniu M, Hall P, Shively JE and Chen S. Detection of intratumoral aromatase in breast carcinomas. An immunohistochemical study with clinicopathologic correlation. *Am J Pathol* 1992; 140: 337-343.
- [60] Blankenstein MA, van de Ven J, Maitimu-Smeele I, Donker GH, de Jong PC, Daroszewski J, Szymczak J, Milewicz A and Thijssen JH. Intratumoral levels of estrogens in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 69: 293-297.
- [61] Liao DJ and Dickson RB. Roles of androgens in the development, growth, and carcinogenesis of the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 80: 175-189.
- [62] Perel E, Davis S and Killinger DW. Androgen metabolism in male and female breast tissue. *Steroids* 1981; 37: 345-352.
- [63] Perel E and Killinger DW. The metabolism of androstenedione and testosterone to C19 metabolites in normal breast, breast carcinoma and benign prostatic hypertrophy tissue. *J Steroid Biochem* 1983; 19: 1135-1139.
- [64] Chetrite GS, Cortes-Prieto J, Philippe JC, Wright F and Pasqualini JR. Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase

- activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 72: 23-27.
- [65] Haynes BP, Straume AH, Geisler J, A'Hern R, Helle H, Smith IE, Lonning PE and Dowsett M. Intratumoral estrogen disposition in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1790-1801.
- [66] Lonning PE, Helle H, Duong NK, Ekse D, Aas T and Geisler J. Tissue estradiol is selectively elevated in receptor positive breast cancers while tumour estrone is reduced independent of receptor status. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; 117: 31-41.
- [67] Queiroga FL, Perez-Alenza MD, Silvan G, Pena L, Lopes C and Illera JC. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 94: 181-187.
- [68] Perel E, Blackstein ME and Killinger DW. Aromatase in human breast carcinoma. *Cancer Res* 1982; 42: 3369s-3372s.
- [69] Sasano H and Harada N. Intratumoral aromatase in human breast, endometrial, and ovarian malignancies. *Endocr Rev* 1998; 19: 593-607.
- [70] Yue W, Santen RJ, Wang JP, Hamilton CJ and Demers LM. Aromatase within the breast. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6: 157-164.
- [71] Lakhani SR, Ellis. I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver, M.J. WHO Classification of Tumours of the Breast. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2012.
- [72] Elston CW and Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 2002; 41: 154-161.
- [73] Peña L, De Andres PJ, Clemente M, Cuesta P and Perez-Alenza MD. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas

in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol* 2013; 50: 94-105.

- [74] Allred DC, Harvey JM, Berardo M and Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 1998; 11: 155-168.
- [75] Uva P, Aurisicchio L, Watters J, Loboda A, Kulkarni A, Castle J, Palombo F, Viti V, Mesiti G, Zappulli V, Marconato L, Abramo F, Ciliberto G, Lahm A, La Monica N and de Rinaldis E. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics* 2009; 10: 135.
- [76] Rasotto R, Goldschmidt MH, Castagnaro M, Carnier P, Caliarì D and Zappulli V. The dog as a natural animal model for study of the mammary myoepithelial basal cell lineage and its role in mammary carcinogenesis. *J Comp Pathol* 2014; 151: 166-180.
- [77] Selim AG, El-Ayat G and Wells CA. Androgen receptor expression in ductal carcinoma in situ of the breast: relation to oestrogen and progesterone receptors. *J Clin Pathol* 2002; 55: 14-16.
- [78] Moinfar F, Okcu M, Tsybrovskyy O, Regitnig P, Lax SF, Weybora W, Ratschek M, Tavassoli FA and Denk H. Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas: potential relevance to new therapeutic strategies. *Cancer* 2003; 98: 703-711.
- [79] Conde I, Alfaro JM, Fraile B, Ruiz A, Paniagua R and Arenas MI. DAX-1 expression in human breast cancer: comparison with estrogen receptors ER-alpha, ER-beta and androgen receptor status. *Breast Cancer Res* 2004; 6: R140-148.

- [80] DeVita VT, Lawrence TS and Rosenberg SA. DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer : principles & practice of oncology. Philadelphia, Pa. ; London: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
- [81] Gago FE, Fanelli MA and Ciocca DR. Co-expression of steroid hormone receptors (estrogen receptor alpha and/or progesterone receptors) and Her2/neu (c-erbB-2) in breast cancer: clinical outcome following tamoxifen-based adjuvant therapy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2006; 98: 36-40.
- [82] Sarvilinna N, Eronen H, Miettinen S, Vienonen A and Ylikomi T. Steroid hormone receptors and coregulators in endocrine-resistant and estrogen-independent breast cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2006; 118: 832-840.
- [83] Sasano H, Nagura H, Harada N, Goukon Y and Kimura M. Immunolocalization of aromatase and other steroidogenic enzymes in human breast disorders. *Hum Pathol* 1994; 25: 530-535.
- [84] Foster PA. Steroid metabolism in breast cancer. *Minerva Endocrinol* 2008; 33: 27-37.
- [85] Hong Y, Li H, Ye J, Miki Y, Yuan YC, Sasano H, Evans DB and Chen S. Epitope characterization of an aromatase monoclonal antibody suitable for the assessment of intratumoral aromatase activity. *PLoS One* 2009; 4: e8050.
- [86] Shenton KC, Dowsett M, Lu Q, Brodie A, Sasano H, Sacks NP and Rowlands MG. Comparison of biochemical aromatase activity with aromatase immunohistochemistry in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 49 Suppl 1: S101-107; discussion S109-119.
- [87] Sasano H, Suzuki T, Miki Y and Moriya T. Intracrinology of estrogens and androgens in breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 108: 181-185.

- [88] Miller WR, Anderson TJ and Jack WJ. Relationship between tumour aromatase activity, tumour characteristics and response to therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990; 37: 1055-1059.
- [89] Mol JA, Selman PJ, Sprang EP, van Neck JW and Oosterlaken-Dijksterhuis MA. The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *J Reprod Fertil Suppl* 1997; 51: 339-344.
- [90] Lantinga-van Leeuwen IS, van Garderen E, Rutteman GR and Mol JA. Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 75: 219-228.
- [91] Guil-Luna S, Sanchez-Cespedes R, Millan Y, De Andres FJ, Rollon E, Domingo V, Guscetti F and Martin de Las Mulas J. Aglepristone decreases proliferation in progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 518-523.

Table 1. Immunoexpression of Aromatase (Arom) and steroid receptors [estrogen receptor α (ER α), estrogen receptor β (ER β), progesterone receptor (PR) and androgen receptor (AR)] in premenopausal human breast cancer (PM-HBC), menopausal human breast cancer (M-HBC) and canine mammary cancer (CMC).

		PM-HBC (a)	a vs. c*	M-HBC (b)	b vs. c*	CMC (c)
Arom^a	TS	4.77 \pm 0.76	$p = 0.696$	5.45 \pm 0.37	$p = 0.133$	4.37 \pm 0.6
Arom (-/+)^b	Negative	4/13 (30.8%)	$p = 0.941$	5/38 (13.2%)	$p = 0.102$	8/27 (29.6%)
	Positive	9/13 (69.2%)		33/38 (86.8%)		19/27 (70.4%)
ERα^a	TS	4.33 \pm 0.96	$p = 0.070$	6.16 \pm 0.47	$p < 0.001$	2.44 \pm 0.53
ERα (-/+)^b	Negative	4/13 (30.8%)	$p = 0.209$	6/38 (15.8%)	$p = 0.002$	14/27 (51.9%)
	Positive	9/13 (69.2%)		32/38 (84.2%)		13/27 (48.1%)
ERβ^a	TS	6.85 \pm 0.32	$p = 0.003$	5.42 \pm 0.31	$p = 0.484$	5.04 \pm 0.48
ERβ (-/+)^b	Negative	0/13 (0.0%)	$p = 0.144$	2/38 (5.3%)	$p = 0.190$	4/27 (14.8%)
	Positive	13/13 (100%)		36/38 (94.7%)		23/27 (85.2%)
PR^a	TS	5.83 \pm 0.89	$p = 0.225$	6.63 \pm 0.42	$p = 0.003$	4.74 \pm 0.44
PR (-/+)^b	Negative	2/13 (15.4%)	$p = 0.962$	4/38 (10.5%)	$p = 0.604$	4/27 (14.8%)
	Positive	11/13 (84.6%)		34/38 (89.5%)		23/27 (85.2%)
AR^a	TS	6.92 \pm 0.35	$p = 0.001$	6.54 \pm 0.22	$p < 0.001$	4.85 \pm 0.37
AR (-/+)^b	Negative	0/13 (0.0%)	$p = 0.314$	0/38 (0.0%)	$p = 0.088$	2/27 (7.4%)
	Positive	13/13 (100%)		38/38 (100%)		25/27 (92.6%)

*Numbers in bold denote significant differences ($p < 0.05$)

^a TS calculated following the Allred Score System

^b (-/+) Positive threshold when TS > 3

Table 2: Tissue homogenate concentrations (mean \pm S.E.M) of 17 β -estradiol (E2). estrone sulphate (SO4E1). progesterone (P4). androstenedione (A4). dehydroepiandrosterone (DHEA). and testosterone (T) and testosterone in premenopausal (PM-HBC) and menopausal (M-HBC) human breast cancer samples. in premenopausal and menopausal human normal breast. in canine mammary cancer (CMC) and in canine normal mammary glands.

	Premenopausal women			Menopausal women			Female dogs		
	Normal breast (n=6)	PM-HBC (n=13)	<i>p</i> value*	Normal breast (n=4)	M-HBC (n=38)	<i>p</i> value*	Normal mammary gland (n=8)	CMC (n=30)	<i>p</i> value*
E2 (pg/g)	237.56 \pm 118.34	758.81 \pm 136.38	0.029	73.86 \pm 15.85	683.93 \pm 88.23	0.032	89.74 \pm 3.82	290.54 \pm 31.8	<0.001
SO4E1 (ng/g)	233.65 \pm 41.31	1229.18 \pm 153.96	<0.001	226.30 \pm 25.84	1283.13 \pm 140.97	0.021	76.51 \pm 5.89	693.44 \pm 85.93	<0.001
P4 (ng/g)	7.14 \pm 0.57	66.04 \pm 4.05	<0.001	12.91 \pm 3.55	71.45 \pm 2.56	<0.001	2.22 \pm 0.12	8.69 \pm 1.12	<0.001
A4 (ng/g)	19.19 \pm 2.61	226.76 \pm 12.57	<0.001	13.66 \pm 1.68	213.79 \pm 9.45	<0.001	11.13 \pm 2.40	102.55 \pm 10.69	<0.001
DHEA (ng/g)	161.46 \pm 19.96	321.47 \pm 50.51	0.052	170.07 \pm 5.59	328.55 \pm 16.39	<0.001	28.24 \pm 6.21	251.44 \pm 13.80	<0.001
T (ng/g)	9.77 \pm 1.39	26.24 \pm 2.74	0.001	8.46 \pm 0.79	27.79 \pm 1.43	<0.001	0.43 \pm 0.07	20.15 \pm 2.97	<0.001

* *p* values in bold denote statistical significant differences between the control tissues and the corresponding breast or mammary cancer.

Table 3: Similarities and differences in the local steroid hormones status in human breast cancer (PM-HBC = premenopausal, M-HBC = menopausal) respect to canine mammary cancer (CMC).

	HBC		
	PM	M	CMC
<i>Similarities:</i>			
Immunohistochemistry ^a			
Aromatase	X	X	X
ER α	X		X
ER β		X	X
PR	X		X
Tumor steroid hormones content ^b			
Increase in tumors respect to control	X	X	X
Comparable levels of androgens in tumor	X	X	X
<i>Differences:</i>			
Immunohistochemistry ^a			
ER α		X	X (lower TS)
ER β	X		X (lower TS)
PR		X	X (lower TS)
AR	X	X	X (lower TS)
Tumor steroid hormones content ^b			
Levels of estrogens and progestagens	X	X	X (lower levels)
Statistical associations ^c	ER α /PR	ER α /PR	ER β /PR

^a Immunohistochemistry of ER α , ER β , PR, and AR.

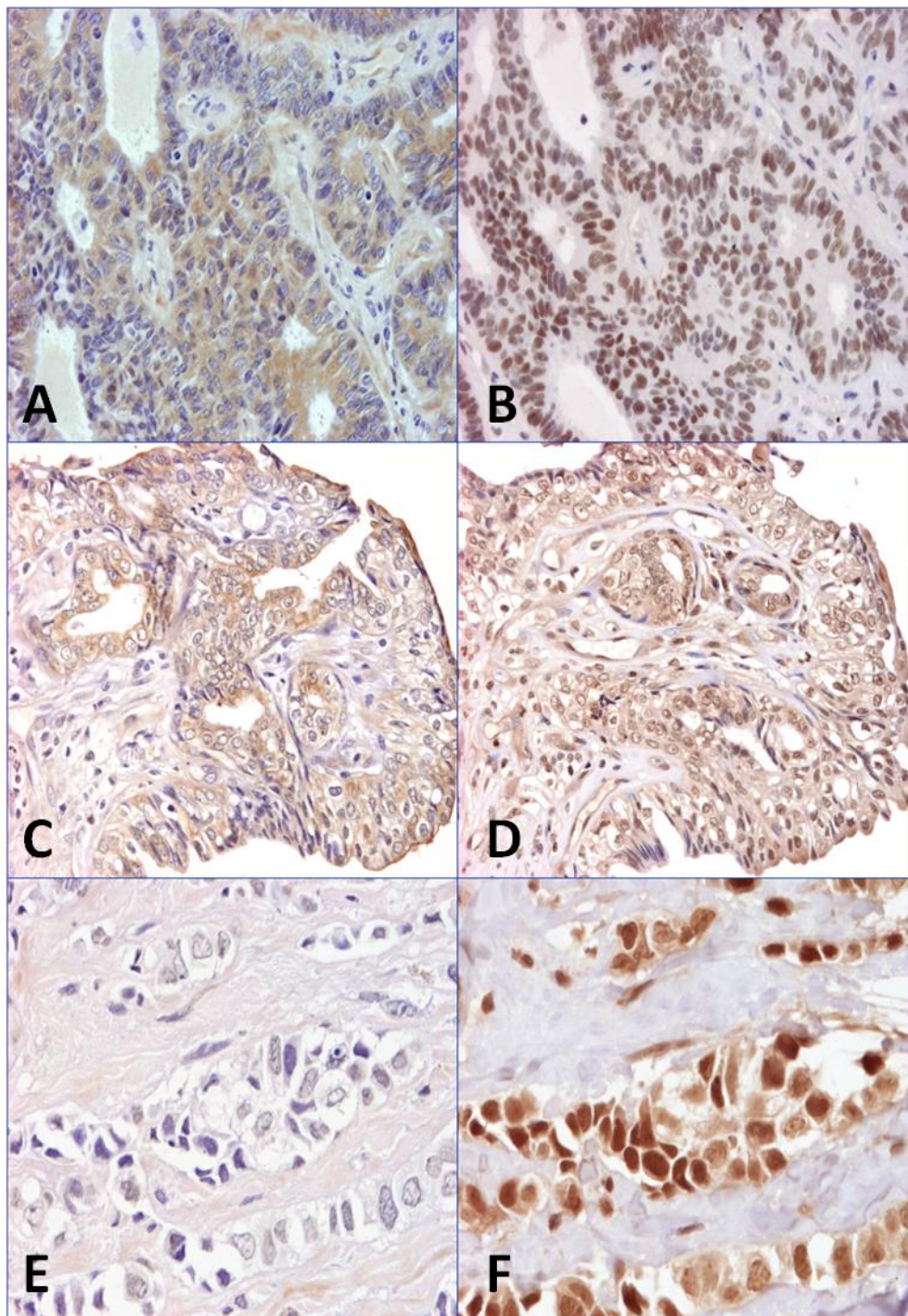
^b 17 β -estradiol (E2), estrone sulphate (SO4E1), progesterone (P4), Androstenedione (A4), dehydroepiandrosterone (DHEA) and testosterone (T) analyzed by EIA.

^c Statistical associations among several markers studied were different in the CMC group, only different associations of ER α and ER β with PR are depicted.

Figure legend

Fig.1. A and B: Human breast cancer. Invasive papillary carcinoma: A) positive aromatase immunostaining; B) positive ER α immunostaining. C and D: Canine mammary cancer. Tubulopapillary carcinoma: C) positive aromatase immunostaining; D) positive ER β immunostaining. E and F: Human breast cancer. Invasive ductal carcinoma: E) negative aromatase immunostaining; F) positive androgen receptor immunostaining.

Fig. 1



ANEXO III

Increased Aromatase Immunoexpression in Canine Inflammatory Mammary Cancer: a Potential Therapeutic Target

de Andrés, P.J.; Cáceres, S.; Clemente, M.; Monsalve, B.; Illera, M.J.; Pérez-Alenza,
M.D.; Illera, J.C. and Peña, L.

Enviado a Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2015

Please download and read the instructions before proceeding to the peer review

Increased aromatase immunoexpression in canine inflammatory mammary cancer: a potential therapeutic target

Journal:	<i>Expert Opinion On Therapeutic Targets</i>
Manuscript ID:	EOTT-2015-0146
Manuscript Type:	Original Research
Keywords:	Aromatase, canine inflammatory mammary cancer, inflammatory breast cancer, steroid receptors, cancer cell lines

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review Only

Increased aromatase immunoexpression in canine inflammatory mammary cancer: a potential therapeutic target.

Paloma Jimena de Andrés¹; Sara Cáceres²; Mónica Clemente¹; Beatriz Monsalve²; Maria José Illera²; Maria Dolores Pérez-Alenza¹; Juan Carlos Illera²; Laura Peña¹.

¹Department of Animal Medicine, Surgery, and Pathology; Veterinary Medicine School; Complutense University of Madrid; Avda. Puerta Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain

²Department of Animal Physiology; Veterinary Medicine School; Complutense University of Madrid; Avda. Puerta Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain

Corresponding autor: Paloma Jimena de Andrés Gamazo

Department of Animal Medicine, Surgery, and Pathology; Veterinary Medicine School; Complutense University of Madrid; Avda. Puerta Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain

Email: pjdeandres@hotmail.com, telephone: +34 913943840, Fax: +34913943808

Preliminary results of this work were presented as a poster at the XXII Meeting of the Spanish Veterinary Anatomic Pathology Society that took place in Valencia, from 16th to 18th of June 2010.

1 **Increased aromatase immunoexpression in**
2 **canine inflammatory mammary cancer: a**
3 **potential therapeutic target.**

For Peer Review Only

4 **Abstract**

5 Canine inflammatory mammary cancer (IMC) has been proposed as a model for the
6 study of human inflammatory breast cancer (IBC). The aims of this study were to
7 compare the immunohistochemical expression of Aromatase (Arom) and several
8 hormone receptors [estrogen receptor α (ER α), estrogen receptor β (ER β), progesterone
9 receptor (PR) and androgen receptor (AR)], in 21 IMC cases *versus* 19 non-IMC; and to
10 study the possible effect of letrozole on canine IMC and human inflammatory breast
11 cancer (IBC) *in vitro* using IPC-366 and SUM-149 cell lines. Significant elevations of
12 the means of Arom Total Score (TS), ER β TS and PR TS were found in the IMC group
13 ($p = 0.025$, $p = 0.038$ and $p = 0.037$, respectively). Secondary IMC tumors expressed
14 higher levels of Arom than primary IMC ($p = 0.029$). Non-IMC PR- tumors contained
15 higher levels of Arom than non-IMC PR+ tumors ($p = 0.007$). After the addition of
16 letrozole, the number of IMC and IBC cells dropped drastically. The overexpression of
17 Arom found and the results obtained *in vitro* further support canine IMC as a model for
18 the study of IBC and future approaches to the treatment of dogs with mammary cancer,
19 and especially IMC, using Arom inhibitors.

20 **Keywords**

21 Aromatase, canine inflammatory mammary cancer, inflammatory breast cancer, steroid
22 receptors, cancer cell lines

23

1. Introduction

Inflammatory breast cancer is a rare and aggressive distinct form of breast cancer both in women and female dogs [named as inflammatory breast cancer (IBC) in women [1] and inflammatory mammary cancer (IMC) in dogs [2, 3], with special epidemiological, clinical, histological and biological characteristics. The increased prevalence of this disease in both species in the last decades, and the low survival rates in spite of recent advances in IBC treatment force the researchers to find specific characteristics of this type of cancer in comparison to other “non-inflammatory” breast cancers. Inflammatory breast cancer and inflammatory mammary cancer are still the most aggressive types of mammary cancers in humans [4, 5] and dogs [3, 6] respectively.

The mechanisms responsible of the aggressive behaviour, poor prognosis and fast clinical evolution of IBC/IMC are poorly understood. Among them, the exacerbated angiogenesis, lymphangiogenesis, and marked lymphangiogenesis have been described to have an important role [7-10]. Two types of IBC [11] and IMC [3] have been identified: primary (without previous history of mammary cancer) and secondary (developed after a previous non-inflammatory mammary cancer). In general, the diagnosis of IBC [12] or IMC [2, 3, 13] is suspected from the clinical characteristics, which includes sudden presentation, edema, hyperaemia, firmness, skin ulceration and warmth, and it is histologically confirmed by the observation of massive embolization of neoplastic cells within the lymphatic vessels of the superficial dermis. Dermal lymphovascular invasion leads to lymphatic obstruction and might be responsible for the highly metastatic potential of IBC [12, 14] and IMC [8]. Canine IMC has been proposed as the best spontaneous animal model for the study of the human disease since IMC presents higher prevalence than IBC and large samples availability from

48 necropsies, generally unexposed to chemotherapy [13]. Recently, a new IMC cell line,
49 named IPC-366 has been established [15]. IPC-366 is a basal-like triple negative
50 (estrogen and progesterone receptors, and HER-2 negative) highly tumorigenic and
51 metastatic *in vivo* cell line that reproduces the histological characteristics of the canine
52 primary IMC [15].

53 It is widely accepted that the mammary gland is a peripheral site producer of steroid
54 hormones [16]. Some enzymes that are responsible for the synthesis of androgens,
55 estrogens and progestagens have been detected in normal and neoplastic mammary
56 gland of several animals including rats [17], goats [18], cows [19], dogs [13, 20-22] and
57 humans [23-25]. Among them, the expression of the enzyme cytochrome P450-
58 Aromatase (Arom, Cyp19a1), which catalyzes the conversion of androgens into
59 estrogens *in situ* (Fig.1), has been analyzed in several studies in human breast cancer
60 [26-29] being the Arom immunoreactivity positively associated to its activity [29].
61 Estrogen receptor α (ER α) expression is associated with tumor growth in estrogen
62 dependent human breast cancer, and it is a selection criteria for using endocrine therapy
63 [14]. Besides anti-estrogen receptor therapy, Arom inhibitors (AI) are also used for the
64 treatment of hormone-dependent human breast cancer, including IBC [14]. Unlike non
65 inflammatory breast cancer tumors (non-IBC), a higher frequency of negative ER α and
66 PR status has been reported in IBC tumors [14]. To the best of our knowledge, there are
67 no studies regarding the expression of Arom and other steroid receptors, such as
68 androgen receptor (AR) and estrogen receptor β (ER β) in IBC.

69 Very little information is available regarding Arom in the canine mammary gland.
70 There are no previous reports of Arom detection using immunohistochemical methods
71 in normal or neoplastic canine mammary tissues and AI are not currently in use for the

72 treatment of canine mammary cancer. In two previous studies Arom mRNA
73 overexpression has been detected in canine mammary tumor samples [21, 22].

74 The presence of cytoplasmic lipid droplets in canine IMC cells is a frequent histological
75 observation; also, a relatively high prevalence of lipid-rich carcinomas among the
76 histological subtypes has been reported [13, 30]. These findings, together with an
77 increased expression of P450-scc enzyme (the first enzyme step of the steroidogenic
78 cascade) (Fig.1), and the high levels of steroid hormones (progesterone, estrogens and
79 androgens) found in IMC tissue homogenates by enzyme immunoassay, support the
80 hypothesis that the lipid secretion of IMC tumors is composed of steroids [13, 31].
81 These hormones have been proposed to promote cell growth and could act in an
82 autocrine or paracrine manner [30, 31]. Furthermore, a different endocrine mechanism
83 has been postulated to participate in the development of this aggressive type of
84 mammary cancer in dogs, including a higher expression of progesterone receptor (PR)
85 in secondary IMC respect to primary IMC [13, 30, 31].

86 In order to find specific differences in the pathogenesis of the inflammatory phenotype,
87 especially regarding steroids synthesis and their receptors, and to test the validity of
88 Arom as a target molecule for the treatment of IMC, the aims of this study were 1) to
89 compare the immunohistochemical expression of Arom and several hormone receptors
90 (AR, ER α , ER β and PR) in canine IMC cases *versus* comparable (grade III) canine non-
91 inflammatory malignant mammary tumors (non-IMC); 2) to study the possible
92 associations among immunolabeling of Arom and the tumor steroid receptors profile as
93 well as to the spay status and type of IMC; and 3) to evaluate the effect of the anti-
94 aromatase drug letrozole in the growth of a novel IMC cell line, IPC-366, and an
95 established triple negative IBC cell line, SUM-149.

96

97 **Methods**

98 **2.1 Animals**

99 Forty specimens of grade III malignant mammary tumors, classified in accordance with
100 the method proposed for canine mammary tumors by Peña and collaborators [32] and
101 with the method proposed for canine subcutaneous and tissues sarcomas by Dennis and
102 collaborators [33] (for the mammary sarcomas and the sarcomatous part of the
103 carcinosarcoma included in the study), from 40 female dogs (IMC, n = 21; non-IMC n =
104 19) attended at the Veterinary Clinical Hospital of the Complutense University of
105 Madrid were selected from an ongoing research on IMC. Animals' ages ranged from 7
106 to 15 years (mean = 10.85 years) for the IMC group and from 3 to 16 years (mean =
107 11.35 years) for the non-IMC group. Distribution of breeds (pure breed 76.2% in IMC
108 group and 73.7% in non-IMC group) and spay status (intact 80.9% in IMC group and
109 94.7% in non-IMC group) were also similar in both groups. Type of IMC (primary,
110 without previous history of mammary tumor n= 10; secondary, after a previous presence
111 of a mammary malignant tumor, n=8; unknown, n = 3), was also recorded.

112 Patients did not receive chemotherapy, hormone therapy or radiotherapy before
113 sampling. This study was performed with the approval of the Animal Research Ethics
114 Committee, of the Complutense University of Madrid.

115 **2.2 Diagnostic procedures**

116 In each case, samples were fixed in neutral formalin, paraffin embedded, routinely
117 processed and histologically diagnosed following a classification system for canine
118 mammary neoplasms [34]. Only cases with both clinical and histopathological

1
2
3 119 diagnoses were included as IMC. Clinical diagnosis of IMC was based on the
4
5 120 previously described features for dogs [2, 3]. Histological confirmation was based on
6
7 121 the presence of superficial dermal lymphovascular invasion [13]. Only malignant
8
9 122 mammary tumors of histological grade III, classified in accordance with the methods
10
11 123 previously indicated [32], were included.

14
15 124 The 21 IMC neoplasms were histologically diagnosed as follows: comedocarcinoma (n
16
17 125 = 7), lipid-rich carcinoma (n = 5), anaplastic carcinoma (n = 4), solid carcinoma (n = 2),
18
19 126 tubulopapillary carcinoma (n = 2), and adenosquamous carcinoma (n = 1). Histological
20
21 127 classification of the 19 non-IMC neoplasms was as follows: solid carcinoma (n = 7),
22
23 128 carcinosarcoma (n = 4), anaplastic carcinoma (n = 2), malignant myoepithelioma (n =
24
25 129 2), tubular carcinoma (n = 1), complex carcinoma (n = 1), sarcoma (n = 1) and
26
27 130 osteosarcoma (n = 1).

31 131 **2.3 Immunohistochemistry of Arom, ER α , ER β , PR and AR**

32
33
34
35 132 Immunohistochemistry of Arom was performed as follows: paraffin sections were
36
37 133 placed in a PT module (Lab Vision) containing an EDTA buffer solution (pH 8.0)
38
39 134 (MAD-004072R/D, Master Diagnostica), heated for 20 minutes at 95°C and cooled
40
41 135 down to 60°C. After this high temperature antigen retrieval protocol, slides were rinsed
42
43 136 out in warm tap water and placed in an automatic immunostainer device (Lab Vision
44
45 137 Corporation) for immunohistochemistry using a peroxidase detection system kit (MAD-
46
47 138 021881QK, UltraVision Quanto-HRP). For the incubation with the primary antibody
48
49 139 (ab35604, Abcam, 1/50, with known reactivity to canine Arom) the slides were placed
50
51 140 in a wet chamber at 4°C overnight. After immunostaining the slides were hematoxylin
52
53 141 counterstained and permanently mounted with Depex. Corresponding negative control
54
55
56
57
58
59
60

slides were done by replacing the primary antibody with a non-reactive antibody. Human placenta and canine ovary slides were used as positive controls. For the hormone receptors, immunohistochemistry was performed on dewaxed sections using the streptavidin-biotin-complex peroxidase method. After a high temperature antigen unmasking protocol (boiling slides in a pressure cooker for 2 min in buffer citrate, pH 6), endogenous peroxidase was blocked by immersion in 0.3% hydrogen peroxide for 15 minutes. Primary antibodies used were: mouse monoclonal anti-Estrogen Receptor α (C-311, Santa Cruz Biotechnology, 1/20), rabbit polyclonal anti-Estrogen Receptor β (06-629, Upstate, 1/200), mouse monoclonal anti-Progesterone Receptor (1A6, Novocastra, 1/40) and rabbit polyclonal anti-Androgen Receptor (N-Ab-2, Thermo Scientific, 1/25). All primary antibodies were incubated at 4°C overnight. Secondary antibody for ER α and PR was horse anti-mouse IgG (BA2000, Vector, diluted 1/400), for ER β was goat anti-rabbit (E0432, Dako, 1/300) and for AR was swine anti-rabbit (E0353, Dako, 1/200). All the secondary antibodies were incubated at room temperature 1 hour. After the secondary antibody, all the slides were subsequently incubated with streptavidin conjugated with peroxidase 30 minutes at room temperature (43-4323, Zymed, 1/400). All washes and dilutions were made in Tris-Buffered Saline (0.1M Tris base, 0.9% NaCl, and pH 7.4). The slides were developed with a chromogen solution containing 25 g of 3-30 diaminobenzidine tetrachloride (D5059, Sigma) and 100 ml of hydrogen peroxide in 100 ml of distilled water, counterstained in hematoxylin (GH5-2-16, Sigma), washed in tap water, dehydrated, cleared in xylene, and mounted. Corresponding negative control slides were obtained by replacing the primary antibody with a non reacting antibody on canine tissues. The positive controls included were: a normal canine uterus used as a positive control for ER α , ER β and PR; when available, adjacent sample of normal mammary glands or hyperplasias were used as additional

1
2
3 167 internal positive controls for these receptors; a sample of normal canine prostate was
4
5 168 used as a positive control for AR and normal canine dermal sebaceous glands were used
6
7 169 as additional internal positive controls for AR immunostaining.
8
9

10
11 170 Following the Allred score system [35], immunohistochemistry results of Arom and
12
13 171 hormone receptors were expressed as a Total Score (TS), calculated as the sum of the
14
15 172 percentage of positive cells (PS) and the intensity of immunolabeling (IS). A sample
16
17 173 was considered positive for Arom and hormone receptors when more than 10% (TS>3)
18
19 174 of tumor cells had positive cytoplasm (for Arom) and nuclei (for hormone receptors).
20
21

22 23 175 **2.4 IPC-366 and SUM-149 cell lines culture; anti-tumor effect of** 24 25 176 **letrozole *in vitro*.** 26 27

28
29 177 IPC-366 cell line, a triple negative IMC- cell line recently established by our group
30
31 178 [15], was cultured in Dulbecco's modified Eagle medium nutrient mixture F-12 Ham
32
33 179 (DMEM/F12) containing 10% foetal bovine serum charcoal stripped (FBS, Sigma
34
35 180 Aldrich), 1% penicillin-streptomycin solution and 1% L-glutamine (Sigma Aldrich).
36
37

38
39 181 SUM-149 (Asterand plc), an established triple negative IBC cell line, was maintained in
40
41 182 Ham's F-12 media supplemented with 10% FBS charcoal stripped (Sigma Aldrich), 1
42
43 183 µg/ml hydrocortisone, 5 µg/ml insulin and 1% penicillin-streptomycin solution and 1%
44
45 184 amphotericin B (Sigma Aldrich).
46
47

48
49 185 The number of cells cultured was 1.5×10^6 cells in 2575-cm² culture flasks. They were
50
51 186 maintained in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide at 37°C. The cell cultures
52
53 187 were observed daily by a phase-contrast microscopy to check the viability and growth.
54

55
56 188 Letrozole (4,4'-[(1H-1,2,4-triazol-1-yl) methylene] bis-benzonitrile) (stock solution 10
57
58 189 mM; Sigma Aldrich), a nonsteroidal aromatase enzyme inhibitor, was dissolved in
59
60

1
2
3 190 DMSO, stored at -20°C and diluted in fresh culture medium immediately before use.
4
5 191 Culture IPC-366 and SUM-149 cells were divided in control group (final concentration
6
7 192 of DMSO <0.1%), and experimental groups in which concentrations of 0.35, 0.70 and
8
9 193 1.05 µmol/l of letrozole were added to the culture medias. Cell counts were performed
10
11 194 with a hemocytometer at 24, 48 and 72 hours after the addition of the drug to the culture
12
13 195 media. Each experiment was carried out 5 times. The counts were expressed as cell
14
15 196 number x 10⁶.

17
18
19 197 **2.5 Cell Viability Assays**

20
21
22 198 Cells were assayed for cell viability utilizing the CellTiter 96® Aqueous One Solution
23
24 199 Cell Proliferation Assay according to the manufacturer's instructions (Promega).
25
26 200 Briefly, media was removed and 100µl of media containing 20µl MTS added to each
27
28 201 well and incubated for 3 hours at 37°C 5% CO₂. Absorbance was read at 490nm with a
29
30 202 96-well SpectraMax 190 UV/Vis plate reader. Cells untreated were taken to represent
31
32 203 100% proliferation and all drug-treated cells were expressed relative to this.

33
34
35
36 204 **2.6 Statistical analysis**

37
38
39 205 Analyses were performed by the statistical software IBM SPSS version 19 (SPSS Inc.,
40
41 206 Chicago, USA) and a conventional $p < 0.05$ level was used to define statistical
42
43 207 significance.

44
45
46
47 208 For the comparisons of tissue samples, two groups were established: IMC and non-
48
49 209 IMC. The categorical variables analyzed and the categories established were as follows:
50
51 210 Spay status (spayed/entire), type of IMC (primary/secondary), Arom and steroid
52
53 211 receptors (negative/positive). Pearson chi-squared statistic analysis was used to test the
54
55 212 association among the different categorical variables within the groups. The numerical
56
57
58
59
60

variables, expressed as the mean \pm S.E of the Allred TS [36], were analyzed for their correlations (bivariate Pearson correlation test) and to find associations with the categorical variables (T tests).

The non-parametric Wilcoxon's Rank Sum Test was used for comparisons in the letrozole experiments with IPC-366 and SUM-149.

3. Results

3.1 Immunoexpression of Arom, ER α , ER β , PR and AR

The immunoexpressions of Arom and steroid receptors (ER α , ER β , PR and AR) are summarized in Table 1.

Arom. Immunolabeling of Arom was cytoplasmatic and granular in the neoplastic cells, and heterogeneous within the same tumor section. Stromal cells showed a variable positive reaction. The mean Arom TS was significantly higher in IMC cases compared with non-IMC cases (5.57 ± 0.55 vs. 3.53 ± 0.69 , respectively, $p = 0.025$) (Fig. 2).

ER α . Positive immunolabeling was found in the nuclei of epithelial, myoepithelial and mesenchymal neoplastic cells with a marked heterogeneous distribution and intensity of positive cells in the tumor sample. Most of the neoplasms in both groups were ER α negative.

ER β . Estrogen receptor β immunolabeling was found in the nuclei of neoplastic (epithelial and myoepithelial) and stromal (fibroblasts, myofibroblasts and endothelial) cells, with a very heterogeneous distribution of positive tumor cells within each sample. Cartilaginous and osseous cells of mixed tumors were all negative. Comparing IMC vs.

235 non-IMC, the mean ER β TS decreased significantly in the non-IMC group (6.1 ± 0.3 vs.
236 4.68 ± 0.57 , respectively, $p = 0.038$). All IMC samples were positive to ER β (21/21,
237 100%) (Fig.3), while 16/19 (81.25%) of non-IMC expressed ER β ($p = 0.058$).

238 *PR*. Progesterone receptor immunolabeling was observed in the nuclei of neoplastic and
239 stromal cells (IMC and non-IMC samples). Inflammatory mammary cancers showed
240 significant higher mean PR TS than the non-IMC group (4.76 ± 0.58 vs. 3.05 ± 0.53 ,
241 respectively, $p = 0.004$) (Fig. 4). Similar percentages of PR positive tumors were found
242 in both groups.

243 *AR*. AR immunolabeling was found in the nuclei of neoplastic and stromal (fibroblasts
244 and myofibroblasts) cells in all the tissues IMC and non-IMC (Fig. 3). AR was
245 heterogeneously expressed among neoplastic cells. Within IMC samples, highly
246 malignant isolated epithelial cells that invaded the dermis and neoplastic cells in emboli,
247 showed strong AR immunolabeling. No statistical differences were found between the
248 two groups of tumors studied.

249 **3.2 Statistical associations of Aromatase immunolabeling**

250 In the IMC group, Arom immunolabeling (TS) was associated with the type of IMC as
251 follows: the mean Arom TS was statistically higher in the secondary IMC vs. the
252 primary IMC (6.88 ± 0.44 vs. 4.30 ± 0.94 , respectively, $p = 0.029$). Additionally, all the
253 secondary IMC tumors (8/8) were positive to Arom immunostaining whereas 60%
254 (6/10) of the primary IMC tumors were positive to Arom. Spay status was not
255 associated to Arom immunolabeling. Besides, ER α TS showed trend towards a
256 significant association with Arom immunolabeling (-/+) since the ER α mean was higher
257 in Arom+ tumors than in Arom- tumors ($p = 0.083$).

258 In the non-IMC group, there was an inverse association between PR (-/+) and Arom as
259 follows: Arom TS mean was higher in PR- tumors than in PR+ tumors (6.20 ± 0.8 vs.
260 2.57 ± 0.75 respectively, $p = 0.007$). Additionally, all PR- tumors (5/5) were Arom+
261 whereas 50% (7/14) of the PR+ tumors were Arom+ ($p = 0.047$).

262 The associations are depicted in Table 2.

263 3.3 Anti-tumor effect and cell viability of letrozole *in vitro*.

264 The addition of letrozole to the culture medium of IPC-366 and SUM-149 diminished
265 the cells counts in all studied dosages, increasing with the dose and the time post-
266 treatment (Fig. 5). Similarly, the results of cell viability showed a reduction of the
267 viability percentage in both cell lines. The largest reductions were observed in the
268 highest dose of letrozole at 72 hours post-treatment in both IPC-366 and SUM-149 (Fig.
269 6).

270 4. Discussion

271 Despite its uniquely aggressive and metastatic phenotype, little is known concerning the
272 etiology and mechanisms that are involved in both IBC and IMC development.
273 However, several mechanisms have been suggested to be specifically involved in
274 IBC/IMC comparing to non-IBC/IMC tumors: in IBC [37-40] and IMC [21] several
275 specific up-regulated genes and molecular signaling pathways have been found. The
276 characteristic exacerbated angiogenesis, lymphangiogenesis and vasculogenic mimicry
277 have been reported in both IBC [37, 41] and IMC [8, 13]. A different endocrine
278 mechanism with an exacerbated local production of steroid hormones, including
279 estrogens and androgens, has been postulated in IMC [30, 31].

280 In the present study a higher mean of Arom TS was found in IMC cases in comparison
281 with highly malignant (grade III) non-inflammatory mammary cancer. To the best of
282 our knowledge this is the first report regarding Arom immunohistochemical (IHC)
283 expression in canine mammary tumors and, particularly, in IMC. This study should also
284 be considered relevant for human medicine since there are no studies concerning Arom
285 immunoexpression in IBC.

286 Although there are no previous reports of Arom IHC detection in canine mammary
287 cancer, a higher Arom mRNA expression in spontaneous canine mammary tumors (8
288 malignant and one benign) respect to experimentally progestins-induced canine
289 mammary hyperplasias (n=6), and both respect to normal mammary gland (n=5) has
290 been reported by RT-PCR [22]. In a previous study of our group the expression of
291 Arom mRNA by RT-PCR was increased in IMC samples with respect to all grades of
292 malignant non-inflammatory mammary tumors and normal mammary tissue samples,
293 although it didn't reach the significant level [21]. The RT-PCR technique lacks the
294 selection of cells included in the analyses compared to immunohistochemistry, which is
295 a disadvantage of RT-PCR considering the histological heterogeneity of canine
296 mammary tumors (i.e. inclusion of stroma and hyperplastic adjacent mammary gland in
297 the analyses of malignant tumor samples). In the present study, only the Arom
298 expression in neoplastic cells has been evaluated.

299 The IHC expression of steroid receptors in IMC tumors and comparable (grade III) non-
300 IMC malignant tumors has been also assessed in this study in order to investigate a
301 possible different profile of steroid receptors between both groups and their relation
302 with Arom immunolabeling. The ER β and PR TS means were higher (p = 0.038 and p =
303 0.037, respectively) in the IMC samples respect to non IMC. In previous reports, a

higher IHC expression of AR and ER β has been described in IMC compared with non-IMC [21, 31]. In our study, the mean of AR TS in IMC group was elevated respect to the non-IMC group, however, this difference was not statistically significant ($p = 0.201$). This discrepancies could be related to a different selection of non-IMC cases, since those previous studies included grades I, II and III of malignant mammary tumors for comparison with IMC, instead of only using grade III tumors, which is more appropriate due to the high malignancy of IMC.

According to previous reports in IMC [42], the values of ER α TS were very low. Most of the IMC cases (85.7%) were ER α negative. ER α was less expressed in IMC compared to non-IMC, although the difference was not statistically significant. In human IBC, the lack of ER α expression is one of the five parameters that belong to the IBC immunophenotypic signature [38, 43]. The low presence of ER α in both species enforces the similarity of the disease in both species.

On the contrary, ER β TS were very high in both groups studied (IMC and non-IMC), which suggest a major role for ER β than for ER α in malignant canine mammary tumors (CMT). In spite of the very few studies on the immunoexpression of ER β in CMT [30, 41, 42], our results support the previous hypothesis [31] of an essential role of ER β not only in canine mammary malignancy but also in the inflammatory phenotype. The possible action of estrogens via ER β in IMC has been previously suggested [30].

An inverse association between Arom (TS and -/+) and PR (-/+) was found in the non-IMC group ($p = 0.007$ and $p = 0.047$, respectively). In the IMC tumors, an association between Arom (-/+) and ER α TS was close to being significant ($p = 0.083$). Only Arom+ tumors expressed ER α . In human breast cancer, when the expression of Arom is compared with ER α and PR expressions, results are controversial. While some reports

328 describe an inverse correlation of Arom immunoreactivity and ER α status [26], others
329 indicate the contrary [28]. According to several reports, PR and Arom
330 immunoexpressions are not associated in human breast cancer [26, 28]. The inverse
331 association between Arom and PR immunoexpression found in CMT deserves further
332 investigation, considering that the female dog is under a prolonged exposition to
333 progestagens during the characteristic long anestrus and that CMT express frequently
334 the PR [44, 45].

335 The treatment of IPC-366 and SUM-149 cells with AI (letrozole) demonstrated a strong
336 inhibition of cell growth at all dosages. The possible mechanisms of action of letrozole
337 on the IPC-366 and SUM-149 cell lines need to be elucidated, among them the role of
338 ER β . It is interesting to note that both cell lines are negative to ER α and PR and that
339 anti-aromatase therapy is only indicated in women with hormone dependent breast
340 cancer. However, it has been found that estrogens can stimulate the growth of triple
341 negative (ER-, PR-, HER2-) breast cancer cells, in the absence of ER α , through an ER
342 that resides at the plasma membrane [46]. This receptor has been named as the G-
343 protein coupled receptor, GPR30 [47, 48], and it is still under study as a target for
344 anticancer therapy [49, 50]. Further studies will demonstrate if AI could be of potential
345 interest in the treatment of determined subsets of triple negative breast cancer, including
346 IBC.

347 Anti-estrogen (tamoxifen) therapy is not routinely used in female dogs with CMT due to
348 severe side-effects[51]. In a pilot study, however, PR antagonists mifepristone or
349 aglepristone have been proven to inhibit the growth of canine mammary tumors [52]. In
350 human breast cancer, intratumor Arom activity has shown to be correlated with the
351 response to treatment with AI [53]. Therefore, the overexpression of Arom found in the

present study supports future studies on the treatment of dogs with IMC using AI, given that ER β seems to have the major role in IMC.

Clinical studies on canine species are needed to study the possible use of AI (letrozole) in ER + and ER- negative mammary tumors as a good alternative for anti-hormone treatment in this species due to its low toxicity. The similar results obtained in both cell lines further support the validity of the canine IMC as a model for the study of the human IBC.

Conclusions

Inflammatory mammary cancer is the most malignant form of breast cancer with an extremely poor outcome. Current researches on the biologic characteristics of both IBC and IMC have made significant strides in the understanding of their aggressive behaviour, but research is still vital in developing targeted therapies. Continued elucidation of individual molecules and their related pathways in IMC would not only give us a greater understanding of this disease but also may provide us with unique therapeutic strategies. In the present study, the increased expression of Arom and ER β found in IMC cases deserves further investigation in order to determine if there is a local conversion of androgens into estrogens (*via* Arom) and their effect on the tumor cell (*via* ER β). The increased Arom expression in IMC tissues and the reduction of growth of IMC and IBC hormone-independent cells after the treatment with letrozole, suggest that Arom is a potential therapeutic target for developing AI therapeutic strategies in spontaneous canine mammary cancer, and especially in IMC. The similar response to letrozole of canine and human neoplastic cells supports the dog as a model for the study of IBC. Yet, our findings pose several questions for future research. For example, an investigation to elucidate which mechanism could explain the growth

376 inhibition caused by letrozole on the triple negative cell lines would be desirable. A
377 better understanding of these mechanisms may provide important biological information
378 improving therapeutic approaches. Accordingly, this topic remains an important area for
379 further investigations.

380

381 **Acknowledgements**

382 This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Education
383 (research project N° SAF 2009-10572 and PhD fellowships). We are grateful to Pedro
384 Aranda for his histological technical assistance.

385 The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Lee BJ, Tannenbaum E. Inflammatory carcinoma of the breast. *Surg Gyn Obs* 1924;39:580.
2. Susaneck SJ, Allen TA, Hoopes J, et al. Inflammatory mammary carcinoma in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983;9:971-76.
3. Pérez-Alenza MD, Tabanera E, Peña L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *J Am Vet Med Assoc* 2001 Oct 15;219(8):1110-4.
4. Hirko KA, Soliman AS, Banerjee M, et al. Characterizing inflammatory breast cancer among Arab Americans in the California, Detroit and New Jersey Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) registries (1988-2008). *Springerplus* 2013 Dec;2(1):3.
5. Gonzalez-Angulo AM, Hennessy BT, Broglio K, et al. Trends for inflammatory breast cancer: is survival improving? *Oncologist* 2007 Aug;12(8):904-12.
6. Marconato L, Romanelli G, Stefanello D, et al. Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008). *J Am Vet Med Assoc* 2009 Oct 15;235(8):967-72.
7. Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Hortobagyi G. Inflammatory breast cancer: a review. *J Clin Oncol* 1992 Jun;10(6):1014-24.
8. Clemente M, Sanchez-Archidona AR, Sardon D, et al. Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. *Vet J* 2013 Mar 11;197(2):427-32.
9. Clemente M, Perez-Alenza MD, Pena L. Metastasis of canine inflammatory versus non-inflammatory mammary tumours. *J Comp Pathol* 2010 Aug-Oct;143(2-3):157-63.

1
2
3 410 10. Pérez-Alenza MD, Tabanera E, Peña L. Inflammatory mammary carcinoma in
4
5 411 dogs: 33 cases (1995-1999). Journal of the American Veterinary Medical Association
6
7 412 2001 Oct 15;219(8):1110-4.
8
9 413 11. Taylor G, Meltzer. Inflammatory carcinoma of the breast. Am J Cancer
10
11 414 1938;33:33-49.
12
13 415 12. Tavassoli FA. Pathology of the breast. 2nd ed. New York [etc.]: McGraw-Hill,
14
15 416 1999.
16
17 417 13. Peña L, Pérez-Alenza MD, Rodríguez-Bertos A, Nieto A. Canine inflammatory
18
19 418 mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications
20
21 419 of 21 cases. Breast Cancer Res Treat 2003 Mar;78(2):141-8.
22
23 420 14. Dawood S, Merajver SD, Viens P, et al. International expert panel on
24
25 421 inflammatory breast cancer: consensus statement for standardized diagnosis and
26
27 422 treatment. Ann Oncol 2011 Mar;22(3):515-23.
28
29 423 15. Caceres S, Pena L, de Andres PJ, et al. Establishment and Characterization of a
30
31 424 New Cell Line of Canine Inflammatory Mammary Cancer: IPC-366. PLoS One
32
33 425 2015;10(3):e0122277.
34
35 426 16. Labrie F. Extragonadal synthesis of sex steroids: intracrinology. Ann Endocrinol
36
37 427 (Paris) 2003 Apr;64(2):95-107.
38
39 428 17. Mori M, Tominaga T, Tamaoki BI. Steroid metabolism in normal mammary
40
41 429 gland and in the dimethylbenzanthracene-induced mammary tumor of rats.
42
43 430 Endocrinology 1978 May;102(5):1387-97.
44
45 431 18. Slotin CA, Heap RB, Christiansen JM, Linzell JL. Synthesis of progesterone by
46
47 432 the mammary gland of the goat. Nature 1970 Jan 24;225(5230):385-6.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 433 19. Belvedere P, Gabai G, Dalla Valle L, et al. Occurrence of steroidogenic enzymes
4
5 434 in the bovine mammary gland at different functional stages. *J Steroid Biochem Mol*
6
7 435 *Biol* 1996 Nov;59(3-4):339-47.
8
9
10 436 20. d'Arville CN, Evans BA, Borthwick G, Pierrepont CG. Aspects of steroid
11
12 437 metabolism in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch. *J Steroid*
13
14 438 *Biochem* 1980 Dec;13(12):1407-11.
15
16 439 21. Sanchez-Archidona AR, Jimenez MA, Perez-Alenza D, et al. Steroid pathway
17
18 440 and oestrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma. *J*
19
20 441 *Steroid Biochem Mol Biol* 2007 May;104(3-5):93-9.
21
22 442 22. Marinelli L, Gabai G, Wolfswinkel J, Mol JA. Mammary steroid metabolizing
23
24 443 enzymes in relation to hyperplasia and tumorigenesis in the dog. *J Steroid Biochem Mol*
25
26 444 *Biol* 2004 Oct;92(3):167-73.
27
28
29 445 23. Miller WR, Telford J, Dixon JM, Shivas AA. Androgen metabolism and
30
31 446 apocrine differentiation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1985;5(1):67-
32
33 447 73.
34
35
36 448 24. Vihko R, Apter D. Endogenous steroids in the pathophysiology of breast cancer.
37
38 449 *Crit Rev Oncol Hematol* 1989;9(1):1-16.
39
40 450 25. Honma N, Takubo K, Sawabe M, et al. Estrogen-metabolizing enzymes in breast
41
42 451 cancers from women over the age of 80 years. *J Clin Endocrinol Metab* 2006
43
44 452 Feb;91(2):607-13.
45
46
47 453 26. Esteban JM, Warsi Z, Haniu M, et al. Detection of intratumoral aromatase in
48
49 454 breast carcinomas. An immunohistochemical study with clinicopathologic correlation.
50
51 455 *Am J Pathol* 1992 Feb;140(2):337-43.
52
53
54 456 27. Suzuki T, Moriya T, Ishida T, et al. Intracrine mechanism of estrogen synthesis
55
56 457 in breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2003 Dec;57(10):460-2.
57
58
59
60

1
2
3 458 28. Lykkesfeldt AE, Henriksen KL, Rasmussen BB, et al. In situ aromatase
4
5 459 expression in primary tumor is associated with estrogen receptor expression but is not
6
7 460 predictive of response to endocrine therapy in advanced breast cancer. BMC Cancer
8
9 461 2009;9:185.
10
11 462 29. Sasano H, Anderson TJ, Silverberg SG, et al. The validation of new aromatase
12
13 463 monoclonal antibodies for immunohistochemistry--a correlation with biochemical
14
15 464 activities in 46 cases of breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol 2005 May;95(1-
16
17 465 5):35-9.
18
19 466 30. Peña L, Silván G, Pérez-Alenza MD, et al. Steroid hormone profile of canine
20
21 467 inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. J Steroid Biochem Mol Biol
22
23 468 2003 Feb;84(2-3):211-6.
24
25 469 31. Illera JC, Pérez-Alenza MD, Nieto A, et al. Steroids and receptors in canine
26
27 470 mammary cancer. Steroids 2006 Jul;71(7):541-8.
28
29 471 32. Peña L, De Andres PJ, Clemente M, et al. Prognostic value of histological
30
31 472 grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with
32
33 473 two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. Vet
34
35 474 Pathol 2013 Jan;50(1):94-105.
36
37 475 33. Dennis MM, McSporran KD, Bacon NJ, et al. Prognostic factors for cutaneous
38
39 476 and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs. Vet Pathol 2011 Jan;48(1):73-84.
40
41 477 34. Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of
42
43 478 canine mammary tumors. Vet Pathol 2011 Jan;48(1):117-31.
44
45 479 35. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors
46
47 480 in breast cancer by immunohistochemical analysis. Modern pathology : an official
48
49 481 journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc 1998
50
51 482 Feb;11(2):155-68.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 483 36. Mattes MD, Mann JM, Ashamalla H, Tejawani A. Routine histopathologic
4 characteristics can predict oncotype DX(TM) recurrence score in subsets of breast
5
6 484
7 cancer patients. *Cancer investigation* 2013 Nov;31(9):604-6.
8
9
10 486 37. Shirakawa K, Tsuda H, Heike Y, et al. Absence of endothelial cells, central
11
12 487 necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer. *Cancer*
13
14 488 *Res* 2001 Jan 15;61(2):445-51.
15
16 489 38. Charafe-Jauffret E, Tarpin C, Viens P, Bertucci F. Defining the molecular
17
18 490 biology of inflammatory breast cancer. *Semin Oncol* 2008 Feb;35(1):41-50.
19
20 491 39. van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, et al. RhoC GTPase, a novel transforming
21
22 492 oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the
23
24 493 inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res* 2000a Oct 15;60(20):5832-8.
25
26 494 40. Bieche I, Lerebours F, Tozlu S, et al. Molecular profiling of inflammatory breast
27
28 495 cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. *Clin Cancer Res*
29
30 496 2004 Oct 15;10(20):6789-95.
31
32 497 41. Shirakawa K, Kobayashi H, Sobajima J, et al. Inflammatory breast cancer:
33
34 498 vasculogenic mimicry and its hemodynamics of an inflammatory breast cancer
35
36 499 xenograft model. *Breast Cancer Res* 2003;5(3):136-9.
37
38 500 42. Port Louis LR, Varshney KC, Nair MG. An immunohistochemical study on the
39
40 501 expression of sex steroid receptors in canine mammary tumors. *ISRN Vet Sci*
41
42 502 2012;2012:378607.
43
44 503 43. Hahnel R, Twaddle E, Vivian AB. Estrogen receptors in human breast cancer. 2.
45
46 504 In vitro binding of estradiol by benign and malignant tumors. *Steroids* 1971
47
48 505 Dec;18(6):681-708.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 506 44. Millanta F, Calandrella M, Bari G, et al. Comparison of steroid receptor
4
5 507 expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues.
6
7 508 Res Vet Sci 2005 Dec;79(3):225-32.
8
9
10 509 45. Millanta F, Caneschi V, Ressel L, et al. Expression of Vascular Endothelial
11
12 510 Growth Factor in Canine Inflammatory and Non-inflammatory Mammary Carcinoma. J
13
14 511 Comp Pathol 2009 Jul 24.
15
16 512 46. Razandi M, Oh P, Pedram A, et al. ERs associate with and regulate the
17
18 513 production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. Molecular
19
20 514 endocrinology 2002 Jan;16(1):100-15.
21
22
23 515 47. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR, Jr. Estrogen-induced activation
24
25 516 of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and
26
27 517 occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of
28
29 518 HB-EGF. Molecular endocrinology 2000 Oct;14(10):1649-60.
30
31
32 519 48. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, et al. A transmembrane intracellular
33
34 520 estrogen receptor mediates rapid cell signaling. Science 2005 Mar 11;307(5715):1625-
35
36 521 30.
37
38 522 49. Girgert R, Emons G, Grundker C. Inhibition of GPR30 by estriol prevents
39
40 523 growth stimulation of triple-negative breast cancer cells by 17beta-estradiol. BMC
41
42 524 Cancer 2014;14:935.
43
44
45 525 50. Girgert R, Emons G, Grundker C. Inactivation of GPR30 reduces growth of
46
47 526 triple-negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy. Breast
48
49 527 cancer research and treatment 2012 Jul;134(1):199-205.
50
51
52 528 51. Morris JS, Dobson JM, Bostock DE. Use of tamoxifen in the control of canine
53
54 529 mammary neoplasia. Vet Rec 1993 Nov 27;133(22):539-42.
55
56
57
58
59
60

- 530 52. Guil-Luna S, Sanchez-Cespedes R, Millan Y, et al. Aglepristone decreases
531 proliferation in progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. J Vet
532 Intern Med 2011 May-Jun;25(3):518-23.
- 533 53. Miller WR, Anderson TJ, Evans DB, et al. An integrated view of aromatase and
534 its inhibition. J Steroid Biochem Mol Biol 2003 Sep;86(3-5):413-21.

Table 1. Immunoexpression of Aromatase (Arom) and hormone receptors[†] in canine inflammatory mammary cancer (IMC) and canine grade III non-inflammatory mammary cancer (non-IMC). Numbers in bold denote significant differences ($p < 0.05$)

		IMC	non-IMC	p values
Arom [†]	Total Score [‡]	5.57 ± 0.55	3.53 ± 0.69	0.025
Arom (-/+) [*]	Negative	4/21 (19.1%)	7/19 (36.8%)	0.208
	Positive	17/21 (80.9%)	12/19 (63.2%)	
ERα [†]	Total Score [‡]	0.71 ± 0.39	1.95 ± 0.6	0.097
ERα (-/+) [*]	Negative	18/21 (85.7%)	13/19 (68.4%)	0.191
	Positive	3/21 (14.3%)	6/19 (31.6%)	
ERβ [†]	Total Score [‡]	6.1 ± 0.3	4.68 ± 0.57	0.038
ERβ (-/+) [*]	Negative	0/21 (0%)	3/19 (15.8%)	0.058
	Positive	21/21 (100%)	16/19 (84.2%)	
PR [†]	Total Score [‡]	4.76 ± 0.58	3.05 ± 0.53	0.037
PR (-/+) [*]	Negative	5/21 (23.8%)	5/19 (26.3%)	0.854
	Positive	16/21 (76.2%)	14/19 (73.7%)	
AR [†]	Total Score [‡]	5.81 ± 0.5	4.89 ± 0.49	0.201
AR (-/+) [*]	Negative	1/21 (4.8%)	2/19 (10.5%)	0.489
	Positive	20/21 (95.2%)	17/19 (89.5%)	

538

539 [†] Estrogen receptor α (ERα), estrogen receptor β (ERβ), progesterone receptor (PR) and androgen receptor (AR)

540 [‡] Total Score (mean ± S.E.M) was calculated using the Allred score system

541 ^{*} (-/+) A sample is positive for Arom and hormone receptors when more than 10% of tumor cells are positive

Table 2. Associations between Aromatase (Arom) immunolabeling and spay status, type of IMC and positive/negative hormone receptors[†] in dogs with canine inflammatory mammary cancer (IMC) and dogs with non-inflammatory malignant mammary tumors (non-IMC MMT). Numbers in bold denote significant differences ($p < 0.05$).

		IMC	p values	Non-IMC	p values
		Arom [‡] (Mean \pm S.E.M.)		Arom [‡] (Mean \pm S.E.M.)	
Spay status	Spayed (n = 4)	5.25 \pm 1.75	p = 0.785	Spayed (n = 1)	0
	Entire (n = 17)	5.65 \pm 0.57		Entire (n = 18)	3.72 \pm 0.69
Type of IMC	Primary (n = 10)	4.30 \pm 0.94	p = 0.029		
	Secondary (n = 8)	6.88 \pm 0.44			
ERα[†] (+/-)*	ER α + (n = 3)	5.67 \pm 0.67	p = 0.946	ER α + (n = 6)	4.00 \pm 1.37
	ER α – (n = 18)	5.56 \pm 0.64		ER α – (n = 13)	3.31 \pm 0.82
ERβ[†] (+/-)*	ER β + (n = 21)	5.57 \pm 0.55	p = 0.751	ER β + (n = 16)	3.63 \pm 0.78
	ER β – (n = 0)			ER β – (n = 3)	3.00 \pm 1.53
PR[†] (+/-)*	PR + (n = 16)	5.63 \pm 0.59	p = 0.867	PR + (n = 14)	2.57 \pm 0.75
	PR – (n = 5)	5.40 \pm 1.47		PR – (n = 5)	6.20 \pm 0.80
AR[†] (+/-)*	AR + (n = 20)	5.45 \pm 0.56	p = 0.336	AR + (n = 17)	3.65 \pm 0.74
	AR – (n = 1)	8.00		AR – (n = 2)	2.50 2.50

[†]Estrogen receptor α (ER α), estrogen receptor β (ER β), progesterone receptor (PR) and androgen receptor (AR)

[‡] Arom immunolabeling Total Score (mean \pm S.E.M) was calculated using the Allred score system

* (-/+) A sample is positive for hormone receptors when more than 10% of tumor cells are positive

551 **Legends**

552 Figure 1: Steroidogenesis cascade with cytochrome P-450 aromatase (Arom)
553 participation.

554 Figure 2: Streptavidin-biotin peroxidase method anti-aromatase (Arom). A: Intense
555 positive Arom cytoplasmic immunostaining in canine inflammatory mammary cancer
556 cells (solid carcinoma), original magnification 20x; B: Weak positive Arom cytoplasmic
557 immunostaining in canine non-inflammatory malignant mammary cancer (tubular
558 carcinoma), original magnification 20x.

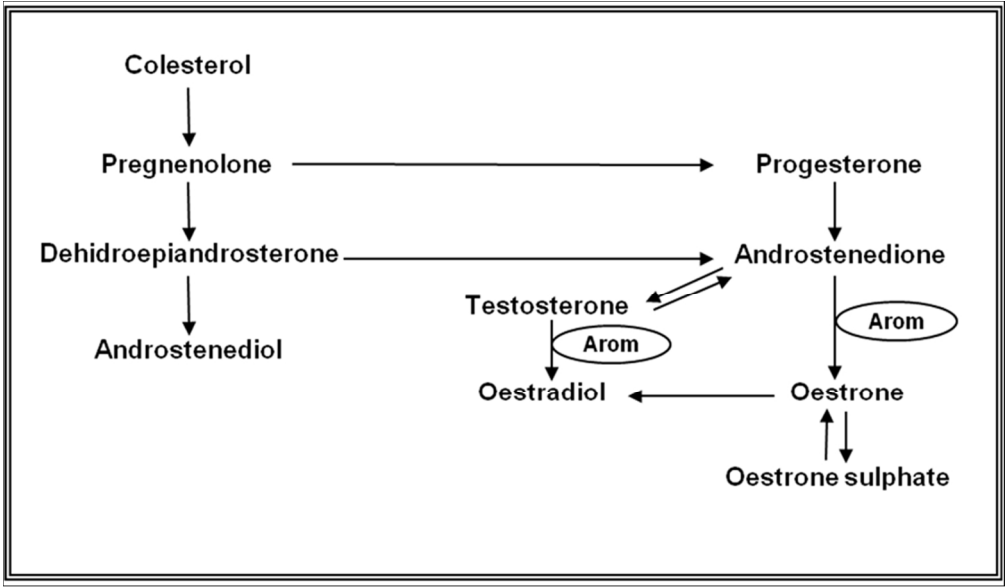
559 Figure 3: A: Streptavidin-biotin peroxidase anti-estrogen receptor β (ER β). Intense
560 positive ER β nuclear immunostaining in canine inflammatory mammary cancer
561 (comedocarcinoma), original magnification 20x. B: Streptavidin-biotin peroxidase
562 method anti-androgen receptor (AR). Intense positive AR nuclear immunostaining in
563 canine non-inflammatory mammary cancer (tubular carcinoma), original magnification
564 20x.

565 Figure 4: Streptavidin-biotin peroxidase method anti-progesterone receptor (PR). A:
566 Intense positive PR nuclear immunostaining in canine inflammatory mammary cancer
567 (anaplastic carcinoma), original magnification 20x. B: Scattered positive PR nuclei in
568 canine non-inflammatory mammary cancer (tubular carcinoma), original magnification
569 20x.

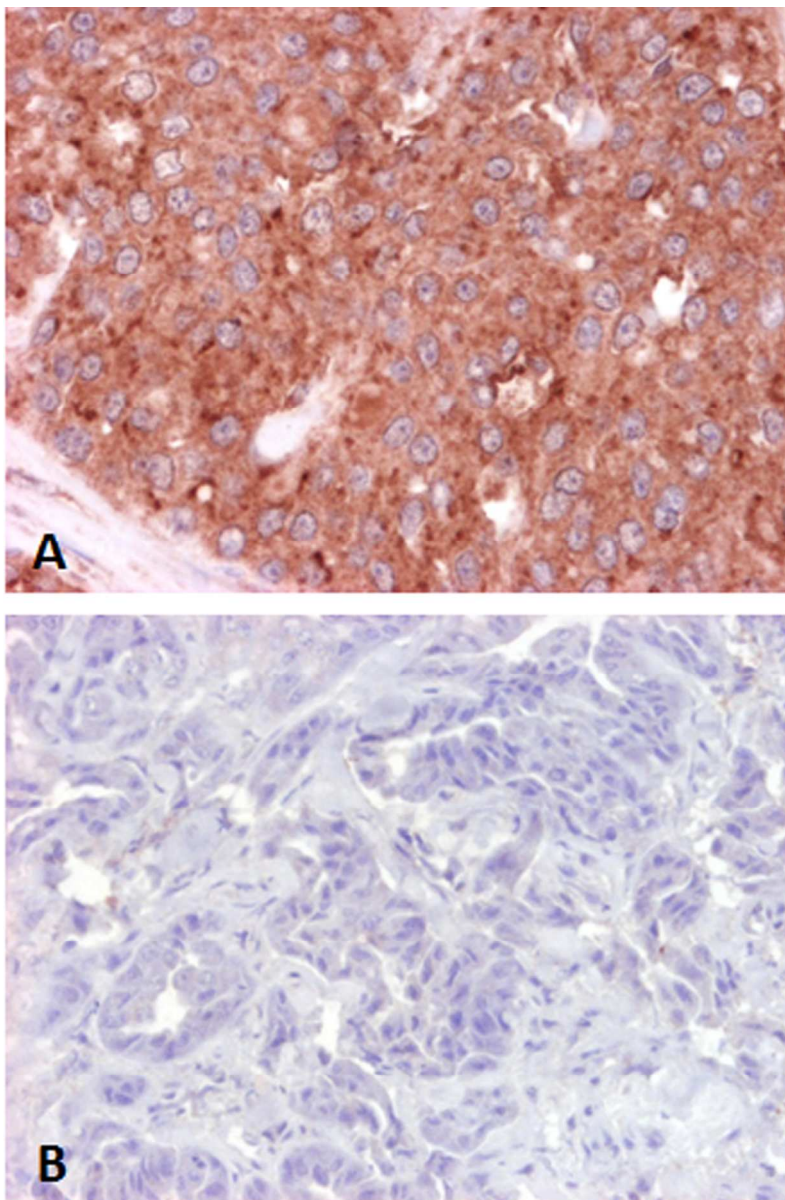
570 Figure 5: Effect of different dosage of letrozole (17.5, 35 and 52 nM) on cell
571 proliferation in IPC-366 (A) and SUM-149 (B) cell lines. Data are shown as arithmetic
572 means \pm standard error of the mean (S.E.M.).

573 Figure 6. Effects of letrozole on proliferation of IPC-366 (A) and SUM-149 (B) cells *in*
574 *vitro*. Viability of cells was measured by MTT assay after 24, 48 and 72 hours treatment

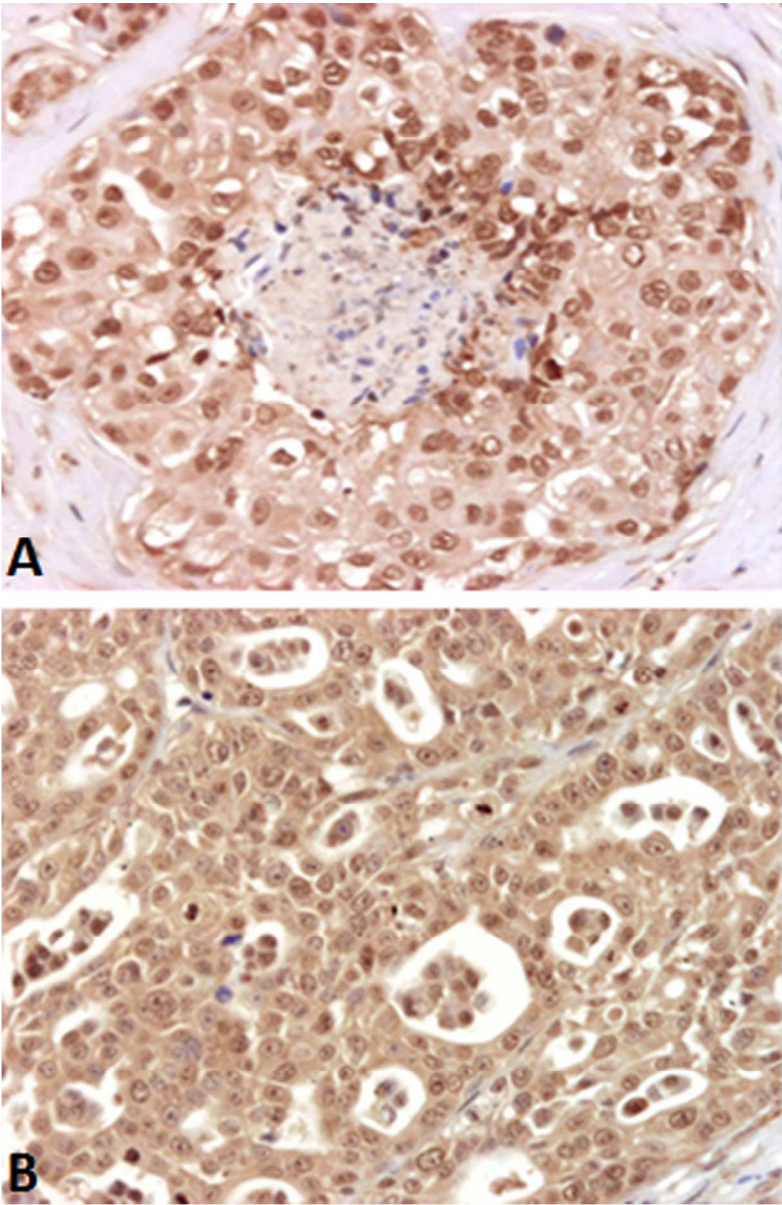
1
2
3 575 with letrozole. The treatment with letrozole reduces cell viability in both cell lines at all
4
5 576 doses. Results shown are the average of three separate MTS assays each done in
6
7 577 quadruplicate.
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



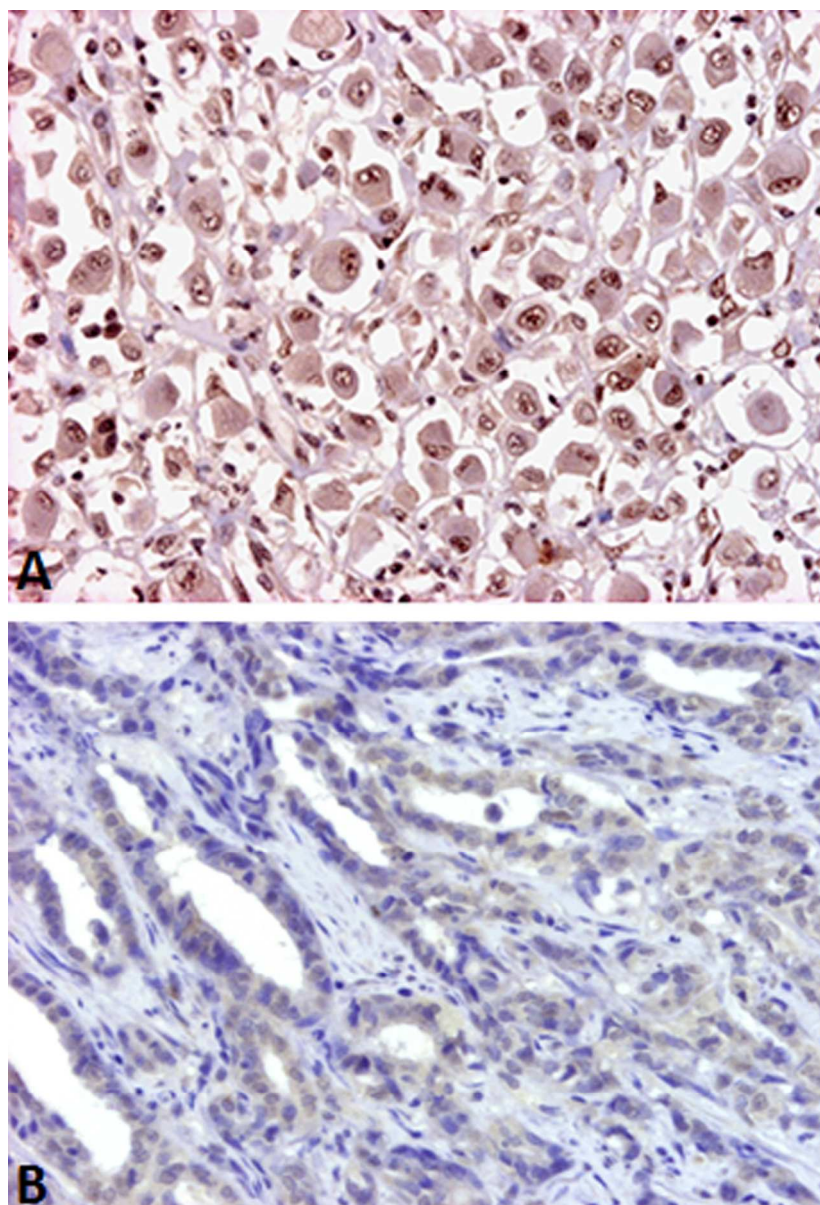
Steroidogenesis cascade with cytochrome P-450 aromatase (Arom) participation.
254x148mm (150 x 150 DPI)



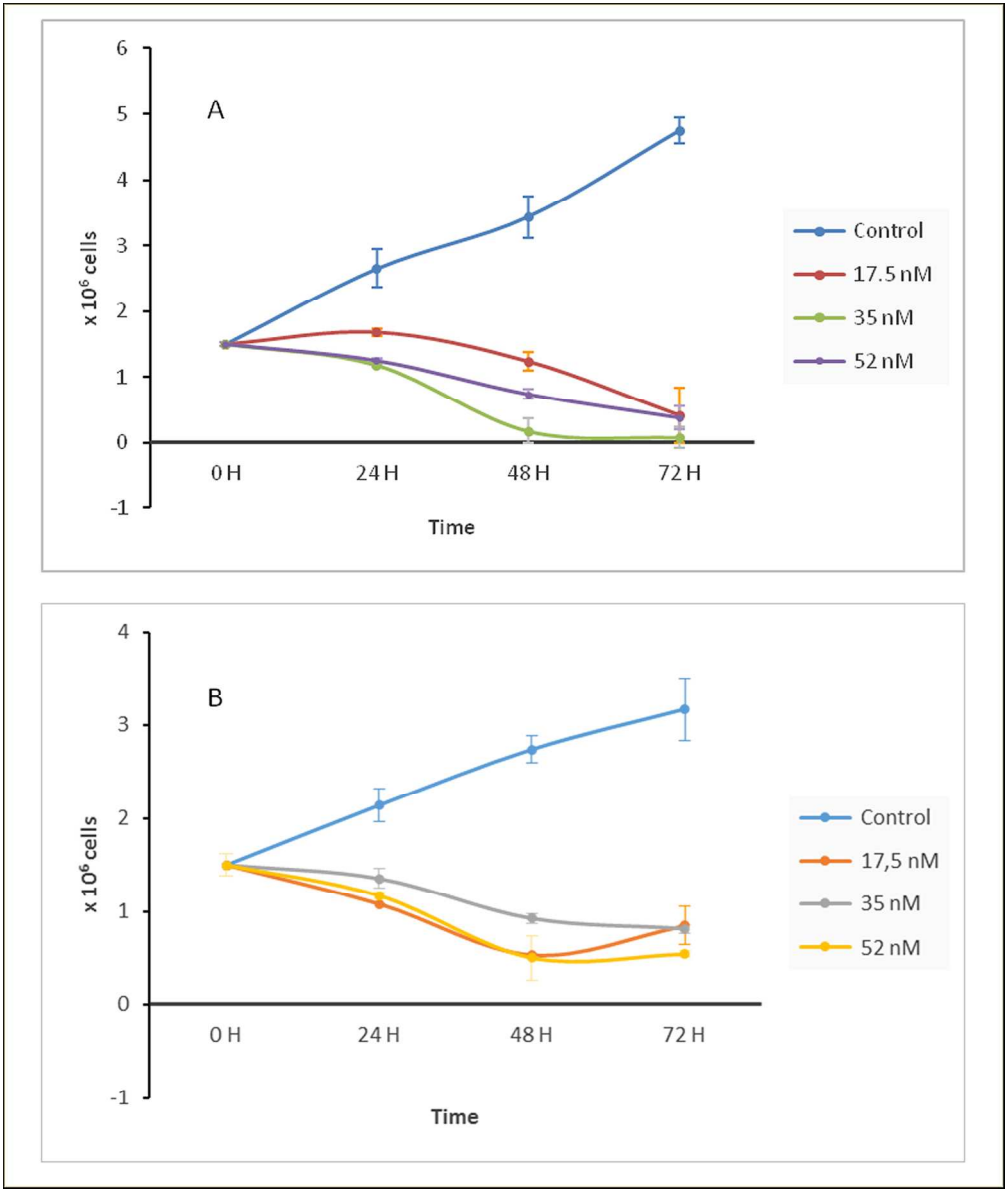
Streptavidin-biotin peroxidase method anti-aromatase (Arom). A: Intense positive Arom cytoplasmic immunostaining in canine inflammatory mammary cancer cells (solid carcinoma), original magnification 20x; B: Weak positive Arom cytoplasmic immunostaining in canine non-inflammatory malignant mammary cancer (tubular carcinoma), original magnification 20x
90x137mm (300 x 300 DPI)



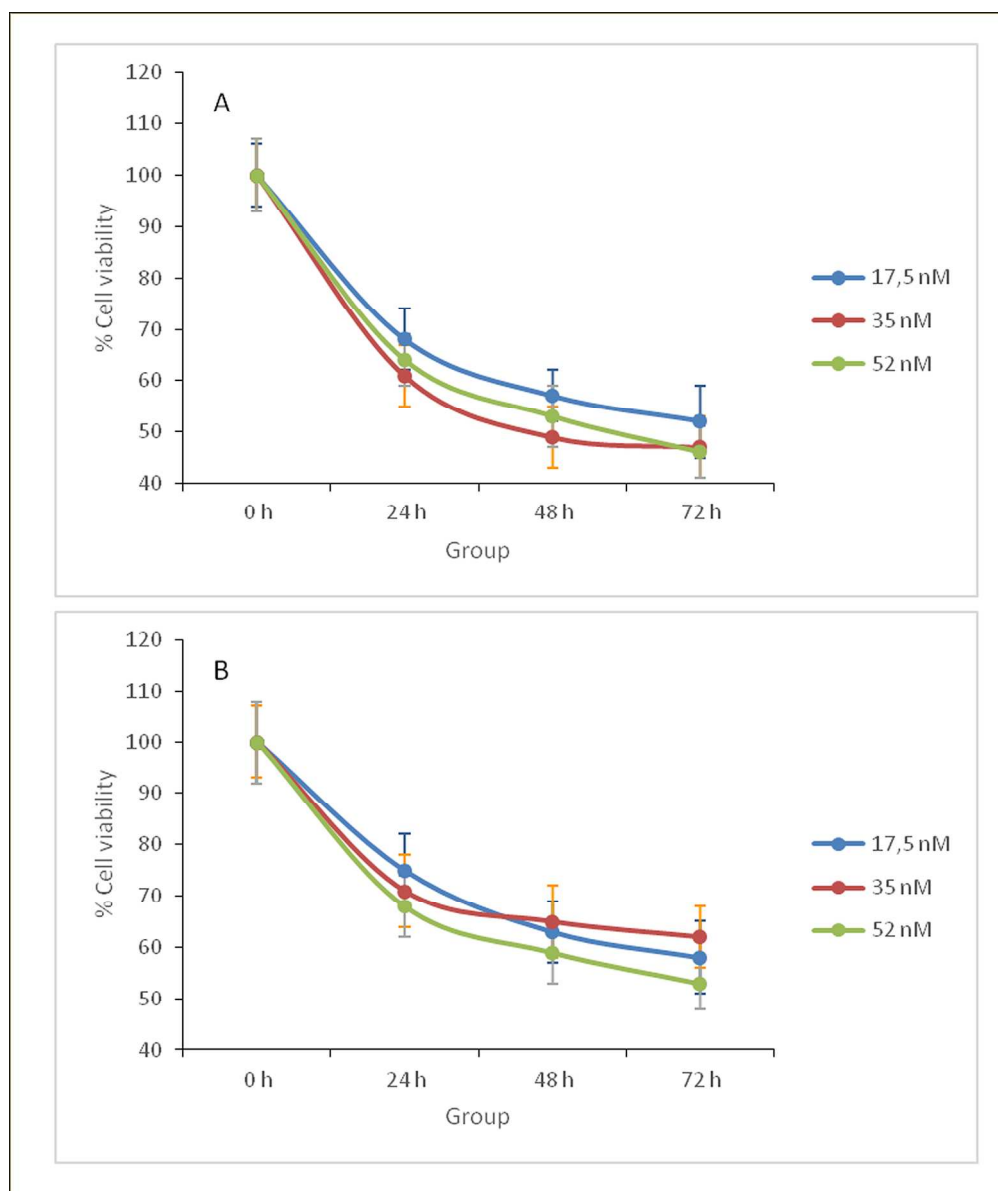
A: Streptavidin-biotin peroxidase anti-estrogen receptor β (ER β). Intense positive ER β nuclear immunostaining in canine inflammatory mammary cancer (comedocarcinoma), original magnification 20x. B: Streptavidin-biotin peroxidase method anti-androgen receptor (AR). Intense positive AR nuclear immunostaining in canine non-inflammatory mammary cancer (tubular carcinoma), original magnification 20x.
90x138mm (300 x 300 DPI)



Streptavidin-biotin peroxidase method anti-progesterone receptor (PR). A: Intense positive PR nuclear immunostaining in canine inflammatory mammary cancer (anaplastic carcinoma), original magnification 20x. B: Scattered positive PR nuclei in canine non-inflammatory mammary cancer (tubular carcinoma), original magnification 20x. 90x131mm (300 x 300 DPI)



Effect of different dosage of letrozole (17.5, 35 and 52 nM) on cell proliferation in IPC-366 (A) and SUM-149 (B) cell lines. Data are shown as arithmetic means \pm standard error of the mean (S.E.M.) 138x163mm (300 x 300 DPI)



Effects of letrozole on proliferation of IPC-366 (A) and SUM-149 (B) cells in vitro. Viability of cells was measured by MTT assay after 24, 48 and 72 hours treatment with letrozole. The treatment with letrozole reduces cell viability in both cell lines at all doses. Results shown are the average of three separate MTS assays each done in quadruplicate.

138x163mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

List of abbreviations

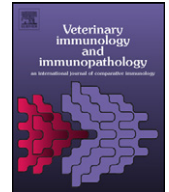
- AI: Arom inhibitors;
- AR: androgen receptor;
- Arom: enzyme cytochrome P450-Aromatase;
- ER α : estrogen receptor α ;
- ER β : estrogen receptor β ;
- IBC: Inflammatory breast cancer;
- IHC: immunohistochemical;
- IMC: Inflammatory mammary cancer;
- non-IBC: non-inflammatory human breast cancer tumors;
- non-IMC: non-inflammatory canine malignant mammary tumors;
- PR: progesterone receptor;
- CMT: canine mammary tumors

ANEXO IV

Increased Levels of Interleukins 8 and 10 as Findings of Canine Inflammatory Mammary Cancer

de Andrés, P.J.; Illera, J.C.; Cáceres, S.; Díez, L., Pérez-Alenza, M.D. and Peña, L.

Veterinary Immunology and Immunopathology 152: 245-251, 2013



Research paper

Increased levels of interleukins 8 and 10 as findings of canine inflammatory mammary cancer

Paloma Jimena de Andrés^{a,*}, Juan Carlos Illera^b, Sara Cáceres^b, Lucía Díez^a,
 María Dolores Pérez-Alenza^a, Laura Peña^a

^a Dept. Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria, Avda/Puerta de Hierro s/n, 28040, Universidad Complutense de Madrid, Spain

^b Dept. Fisiología Animal. Facultad de Veterinaria, Avda/Puerta de Hierro s/n, 28040, Universidad Complutense de Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2012

Received in revised form

14 December 2012

Accepted 20 December 2012

Keywords:

Interleukins

Inflammatory mammary cancer

Inflammatory breast cancer

IBC

Canine

Animal model

ABSTRACT

Inflammatory mammary cancer (IMC) is a distinct form of mammary cancer that affects dogs and women [in humans, IMC is known as inflammatory breast cancer (IBC)], and is characterized by a sudden onset and an aggressive clinical course. Spontaneous canine IMC shares epidemiologic, histopathological and clinical characteristics with the disease in humans and has been proposed as the best spontaneous animal model for studying IBC, although several aspects remain unstudied. Interleukins (ILs) play an important role in cancer as potential modulators of angiogenesis, leukocyte infiltration and tumor growth. The aims of the present study were to assess serum and tumor levels of several ILs (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10) by enzyme-immunoassay in dogs bearing benign and malignant mammary tumors, including dogs with IMC, for a better understanding of this disease. Forty-eight dogs were prospectively included. Animals consisted of 7 healthy Beagles used as donors for normal mammary glands (NMG) and serum controls (SCs), 10 dogs with hyperplasias and benign mammary tumors (HBMT), 24 with non-inflammatory malignant mammary tumors (non-IMC MMT) and 7 dogs with clinical and pathological IMC. IL-8 (serum) and IL-10 (serum and tissue homogenate) levels were higher in the dogs with IMC compared with the non-IMC MMT group. ILs were increased with tumor malignancy as follows: in tumor homogenates IL-6 levels were higher in malignant tumors (IMC and non-IMC MMT) versus HBMT and versus NMG and tumor IL-8 was increased in malignant tumors versus NMG; in serum, IL-1 α and IL-8 levels were higher in the malignant groups respect to HBMT and SCs; interestingly, IL-10 was elevated only in the serum of IMC animals. To the best of our knowledge, this is the first report that analyzes ILs in IMC and IL-10 in canine mammary tumors. Our results indicate a role for IL-6, IL-8 and IL-10 in canine mammary malignancy and specific differences in ILs content in IMC versus non-IMC MMT that could have future diagnostic and therapeutic implications, to be confirmed in a larger series of IMC cases. These results help to support the validity of the IMC canine model for the study of human IBC and provide insight into this uncommon malignancy in dogs.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Inflammatory mammary cancer (IMC) is a rare form of mammary cancer that affects dogs and women [in humans, IMC is known as inflammatory breast cancer (IBC)] and is characterized by a sudden onset and an aggressive clinical course (Lee and Tannenbaum, 1924; Susaneck et al., 1983;

* Corresponding author. Tel.: +34 913943740; fax: +34 913943808.
 E-mail address: pjdeandres@hotmail.com (P.J. de Andrés).

Pérez-Alenza et al., 2001). In the dog, the clinical appearance of IMC, which includes edema, hyperemia, firmness, skin ulceration and warmth, is similar to that described in women with IBC (Haagensen, 1956). Clinically observed inflammatory symptoms are a manifestation of dermal lymphatic involvement; tumor cell invasion in the dermal lymphatic channels is required for a pathological diagnosis (Susaneck et al., 1983; Tavassoli, 1999; Pérez-Alenza et al., 2001; Peña et al., 2003). Histologically, inflammatory infiltrate is not relevant in IMC cases (Peña et al., 2003). In the dog, the reported mean survival after diagnoses is less than 60 days when treated with either palliative therapy with broad-spectrum antibiotic and anti-inflammatory drugs (glucocorticoids or NSAIDs) (Pérez-Alenza et al., 2001; Clemente et al., 2009; Marconato et al., 2009) or chemotherapy (Clemente et al., 2009; de M. Souza et al., 2009). However, a better result has been achieved with an anti-cyclooxygenase 2 treatment; the mean survival for 7 piroxicam-treated dogs was 171 days (de M. Souza et al., 2009). In women, the recent median overall survival time is 4.2 years, which is low, despite new multimodality treatments (Gonzalez-Angulo et al., 2007).

Spontaneous canine IMC has been proposed as the best spontaneous animal model for studying IBC; moreover, IMC presents several advantages compared with IBC, such as higher prevalence, necropsy availability and larger samples, the majority of which have been acquired prior to chemotherapy (Peña et al., 2003). Still, little is known about the specific characteristics of canine IMC (Susaneck et al., 1983; Pérez-Alenza et al., 2001; Peña et al., 2003; Queiroga et al., 2005; Illera et al., 2006; Sánchez-Archidona et al., 2007; Clemente et al., 2009, 2010; de M. Souza et al., 2009; Marconato et al., 2009; Millanta et al., 2010).

Inflammatory breast cancer is a distinct form of locally advanced breast cancer, and the mechanisms responsible for the aggressive clinical evolution are incompletely understood; highly angiogenic, invasive and metastatic features are common to IBC and IMC (Jaiyesimi et al., 1992; Pérez-Alenza et al., 2001). In the dog, there is histopathological evidence that IMC tumor cells secrete lipids, which may be steroids (Peña et al., 2003). Moreover, the generation of microvascular channels by malignant tumor cells without endothelial cell participation (i.e., vasculogenic mimicry) has been reported in IBC (Shirakawa et al., 2001, 2002a,b,c, 2003; Kobayashi et al., 2002) and IMC (Clemente et al., 2010) and could be associated with high lymphangiogenic capacity and metastatic lymphangiotropism that are characteristic of this type of cancer (Clemente et al., 2010).

Cytokines are a large family of soluble, short-acting intercellular communication proteins that play important roles in inflammation, immunity and tissue homeostasis. Interleukins (ILs) are cytokines that mediate communication between leukocytes (Coico et al., 2003). A new hypothesis that is gaining acceptance suggests that some ILs could also play an important role in cancer as potential modulators of angiogenesis and leukocyte infiltration (Chavey et al., 2007). Inflammatory ILs, including IL-6 and IL-8, have been related to poor prognosis and can act as autocrine and paracrine growth factors in several types of human cancer (Angelo and Kurzrock, 2007). Still,

little is known regarding the specific roles of the different ILs in cancer in general and in breast cancer in particular. Interleukin 1 (IL-1), which is a major pro-inflammatory cytokine, plays an important role in early tumor growth and metastasis by initiating the production of other mediators of invasiveness and angiogenesis (Li et al., 1995; Apte et al., 2006; Lewis et al., 2006). Interleukin-6 (IL-6) is another pro-inflammatory cytokine that promotes tumor growth by up-regulating antiapoptotic and angiogenic proteins in tumor cells, can stimulate the activity of enzymes that are involved in estrogen synthesis (Purohit et al., 2002) and it is also able to stimulate motility and decrease cell adhesion in breast cancer cell lines (Verhasselt et al., 1992; Asgeirsson et al., 1998; Arihiro et al., 2000). Interleukin-8, also termed CXCL8, could have a significant role in malignancy since it is involved in breast cancer invasion and angiogenesis (Lin et al., 2004). Interleukin-10, which is a down-regulator of immune responses (Coico et al., 2003), has been correlated with cancer associated-immunosuppression (Khong and Restifo, 2002).

The role of ILs in human breast cancer has been further investigated; ILs are known to have both tumor-promoting and inhibitory effects on breast cancer proliferation by binding specific receptors (Chavey et al., 2007). It is known that ILs can be produced either by inflammatory cells (tumour-associated macrophages and tumour-infiltrating lymphocytes) or by neoplastic mammary cells (Wilson and Balkwill, 2002; Freund et al., 2003). High IL-1, IL-6, IL-8 and IL-10 expression levels have been found in breast cancer patient sera and in breast tumor samples (Reed et al., 1992; Merendino et al., 1996; Kozlowski et al., 2003; Chavey et al., 2007; Knupfer and Preiss, 2007; Lyon et al., 2008), and elevated IL-6, IL-8 and IL-10 levels in breast cancer patient sera have also been associated with advanced clinical stage and poor prognosis (Merendino et al., 1996; Bachelot et al., 2003; Kozlowski et al., 2003; Benoy et al., 2004; Mettler et al., 2004; Derin et al., 2007).

In contrast, little is known about the role of these cytokines in human IBC, and a number of these results contradict one another. Interleukin-6 and IL-8 appear to be produced by IBC tumor cell lines (Van Golen et al., 2000). Others detected IL-1 β and IL-8 in IBC-xenograft cells and in an IBC cell line; EIA-detected IL-8 levels were higher in IBC xenograft-derived murine sera and culture media compared with non-IBC xenograft-derived samples (Shirakawa et al., 2001). Bieche et al. (2004) found only higher IL-6 mRNA expression levels in IBC tumor samples compared with locally advanced breast cancer tumor samples; but no differences of the expression of IL-1 α , IL-1 β , IL-8, and IL-10 were found.

To date, only three studies have demonstrated the presence of several ILs in CMTs (Kim et al., 2010; Zuccari et al., 2011; Gelaleti et al., 2012). Using immunohistochemistry techniques, IL-1 and IL-6 immunoexpressions were higher in malignant and metastatic tumors compared with benign CMTs (Kim et al., 2010). Interleukin-8 has also been detected in CMTs; results are contradictory, though. It was initially suggested that IL-8 could play a protective role against canine mammary cancer (Zuccari et al., 2011), but later an association between high levels of serum IL-8 and a poor prognosis was reported by the same research

group (Gelaleti et al., 2012). To our knowledge, there are no prior reports regarding IL-10 in canine mammary tumors.

The few published data regarding ILs levels in human IBC samples, indicate the participation of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10 in the pathogenesis of IBC. To the best of our knowledge, there are no previous studies that have investigated ILs levels in canine inflammatory mammary cancer. The aims of the present study were to assess serum and tumor levels of the mentioned several ILs (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10) by enzyme-immunoassay in dogs bearing benign and malignant mammary tumors, including dogs with IMC, for a better understanding of this disease and to evaluate the validity of canine IMC as an animal model for the study of human IBC.

2. Materials and methods

2.1. Animals and clinical procedures

Forty-one dogs of various breeds were evaluated at the Complutense University Veterinary Clinic Hospital (HCVC). The animals consisted of the following groups: 10 dogs (ages 6–10 years) with hyperplasias and benign mammary tumors (HBMT), 24 dogs (ages 6–14 years) with non-IMC malignant mammary tumors (MMTs), and 7 dogs (ages 7–14 years) with clinical and pathological IMC. Clinical staging was established using a modified TNM system (Lana et al., 2007). The main characteristics of the animals are shown in Table 1. Seven adult healthy female beagle dogs (ages 7–10 years) without a history of mammary or endocrine disorders were used as serum controls (SCs) and normal mammary gland (NMG) tissue controls (punch biopsies). All dogs with HBMT and non-IMC MMTs were surgically treated. All IMC cases had both clinical and histopathological (i.e., Tru-Cut biopsy or necropsy) diagnoses according to the previously described canine IMC features (Pérez-Alenza et al., 2001). None of the animals had undergone any kind of therapy or treatment before

sample collection. This study was performed with the approval of the Animal Research Ethics Committee of the Complutense University of Madrid.

2.2. Sampling procedure

Forty-eight mammary tissue samples (7 NMGs, 10 HBMT, 24 non-IMC MMTs and 7 IMC) and corresponding serum samples were prospectively collected over a period of 2 years for ILs analyses. All surgical specimens, Tru-Cut biopsies and necropsy samples were histologically diagnosed in the Pathology Service of the HCVC. All mammary samples ($n=48$) were divided into 2 adjacent fragments; one section was processed for histopathology, and the adjacent sections were frozen (-30°C) until being later homogenized. Fasting blood samples ($n=48$) were obtained from each animal before any treatment or surgical procedure. The serum samples were frozen (-30°C) awaiting ILs assays.

2.3. Histopathology

For histopathology, the tissue samples were fixed in formalin, embedded in paraffin and cut into 4- μm sections. The HBMT and non-inflammatory MMTs were diagnosed on hematoxylin–eosin sections following the WHO classification system of canine mammary tumors (Misdorp et al., 1999). All malignant mammary neoplasms included in this study were highly malignant (histological grade III) (Peña et al., 2012). Inflammatory mammary cancer histopathological confirmation was based on the presence of massive dermal lymphatic embolization as previously described (Peña et al., 2003).

2.4. Assessment of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10 levels

The tissue samples for IL analyses were maintained frozen (-30°C) until use. Approximately 0.5 g of mammary tissue were homogenized in 4 ml of phosphate-buffered

Table 1

Epidemiological and clinical characteristics of control dogs and dogs with benign mammary hyperplasias and tumors (HBMT), non inflammatory malignant mammary tumors (non-IMC MMT) and inflammatory mammary cancer (IMC).

Epidemiological and clinical characteristics	Groups			
	Controls ($n=7$)	HBMT ($n=10$)	Non-IMC MMT ($n=24$)	IMC ($n=7$)
Median age	8.2 (range 7–10)	7.9 (range 6–10)	9.9 (range 6–14)	9.3 (range 7–14)
Reproductive status				
Spayed	0	0	0	1 (14.3%)
Entire	7 (100%)	10 (100%)	24 (100%)	6 (85.7%)
Tumor size				
<1 cm		8 (80%)	6 (25%)	0
1–3 cm		2 (20%)	8 (33.3%)	0
>3 cm/skin spread		0	10 (41.6%)	7 (100%)
Tumor ulceration				
No		10 (100%)	21 (87.5%)	5 (71.4%)
Yes		0	3 (12.5%)	2 (28.6%)
Node metastases				
No		10 (100%)	19 (79.2%)	1 (14.3%)
Yes		0	5 (20.8%)	6 (85.7%)
Distant metastases				
No		10 (100%)	24 (100%)	1 (14.3%)
Yes		0	0	6 (85.7%)

saline (PBS) and centrifuged at $1200 \times g$ at 4°C for 25 min; the supernatant was decanted, individually aliquoted and frozen (-30°C) until IL levels were determined.

The IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10 expression levels in tissue homogenates and sera were determined by a sandwich chemiluminescent immunoassay using the Evidence Investigator™ (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK) as per the manufacturer's instructions. In short, increased IL levels in a specimen increased binding to a horseradish peroxidase-labeled antibody, thereby emitting a chemiluminescent signal. The light signals that were generated from the biochip test regions were simultaneously detected using digital imaging technology and compared with a previously prepared calibration curve. The analyte concentrations present in the sample were determined by comparing the analyte measurements with the calibration curve.

The analyzed IL concentrations were expressed in pg/g (in tissue homogenates) and pg/ml (in sera).

2.5. Statistical analyses

The statistical software IBM SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) version 19.0 was used for statistical analysis. Significant differences in the IL levels were determined among the three groups using a one-way ANOVA test and between group pairs using Duncan's test. All of the values were expressed as the mean \pm S.E.M. In all comparisons, a p -value of <0.05 denoted statistical significance.

3. Results

3.1. Histopathological diagnoses

Different histological types of HBMT were diagnosed: ductal papiloma ($n=1$), mammary hyperplasias ($n=2$), complex adenoma ($n=3$) and mixed benign tumors ($n=4$). Histopathology of the non-IMC MMT samples revealed the following histologic subtypes: anaplastic ($n=1$), solid ($n=5$) and tubulopapillary carcinomas ($n=18$). Inflammatory mammary cancers were diagnosed as solid and tubulopapillary carcinomas ($n=4$), anaplastic carcinoma ($n=1$), lipid rich carcinoma ($n=1$) or as carcinosarcoma ($n=1$). The NMG samples that were obtained from the control beagles ($n=7$) lacked histological alterations.

Table 2

Comparison of the tissue homogenate levels (mean \pm S.E.M.) of Interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10 between canine normal mammary glands (NMG), hyperplasias and benign mammary tumors (HBMT), non-inflammatory malignant mammary tumors (non-IMC MMT) and inflammatory mammary cancer samples (IMC).

ILs (pg/g)	Canine tissue type				p -Value ^a
	NMG ($n=7$)	HBMT ($n=10$)	Non-IMC MMT ($n=24$)	IMC ($n=7$)	
IL-1 α	1.68 \pm 0.2 ^a	1.87 \pm 0.28 ^a	1.77 \pm 0.13 ^a	1.47 \pm 0.08 ^a	0.641
IL-1 β	1.48 \pm 0.25 ^a	1.4 \pm 0.15 ^a	1.86 \pm 0.33 ^a	1.53 \pm 0.16 ^a	0.729
IL-6	43.53 \pm 6.62 ^a	151.36 \pm 11.18 ^b	209.42 \pm 15.87 ^c	231.98 \pm 19.01 ^c	<0.001
IL-8	907.03 \pm 100.98 ^a	1110.11 \pm 70.03 ^{a,b}	1251.68 \pm 78.9 ^{b,c}	1561 \pm 105.04 ^c	0.005
IL-10	199 \pm 17.96 ^a	795.87 \pm 90.48 ^a	2012.74 \pm 160.64 ^b	3063.21 \pm 432.38 ^c	<0.001

Values with distinct superscript letters (a–c) denoting statistical differences (p -value <0.05) among groups using Duncan test.

^a ANOVA test (p -value <0.05).

3.2. Tissue homogenate interleukin levels

The IL-6, IL-8 and IL-10 levels in the NMG tissue homogenates were significantly lower compared with IMC and non-IMC MMT samples. Interleukin-6 and IL-10 levels were higher in the malignant tumors (non IMC MMT and IMC tumors) than in the HBMT. Moreover, the IL-10 levels in the IMC tissue homogenates were higher compared with the IL-10 levels in the non-IMC MMT samples; the differences were statistically significant. The IL-1 α and IL-1 β levels were similar in all tissue homogenate groups.

Tissue IL levels are shown in Table 2.

3.3. Serum interleukin levels

Serum IL levels, except for those of IL-1 β , were significantly elevated in the IMC samples compared with the SCs. Furthermore, serum IL-8 and IL-10 levels were significantly higher in the IMC dogs compared with the remaining groups. Interleukin-1 α was increased in the malignant groups (IMC and non-IMC MMT) versus HBMT and SCs.

Serum IL levels are depicted in Table 3.

4. Discussion

Little is known concerning the etiology and pathogenic mechanisms that are involved in both IMC and IBC appearance and development; certain mechanisms have been suggested to be specifically involved in IBC in comparison with other non-inflammatory breast cancer (Charafe-Jauffret et al., 2007) and a different pattern in the production or expression of several ILs (i.e., IL-1 β , IL-6, IL-8) is one of those differential mechanisms of IBC (Van Golen et al., 2000; Shirakawa et al., 2001; Bieche et al., 2004).

To the best of our knowledge, this report is the first in which cytokines have been analyzed in canine inflammatory mammary cancer. To obtain further insight into the molecular pathogenesis of IMC, levels of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10 have been detected in tumor homogenates and sera of 41 dogs with HBMT, non-IMC MMTs and IMC in this study. IL-8 (serum) and IL-10 (serum and tissue homogenate) levels were higher in the dogs with IMC compared with the non-IMC MMT group; these differences were statistically significant. Although some ILs are also increased in inflammatory processes, the differences found in this study between non-IMC MMTs versus IMC should not be attributed to a greater tumor associated

Table 3

Comparison of serum levels (mean \pm S.E.M.) of Interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10 among healthy female dogs (Controls), dogs with hyperplasias and benign mammary tumors (HBMT), dogs with non-inflammatory malignant mammary tumors (non-IMC MMT), and dogs with canine inflammatory mammary cancer (IMC).

ILs (pg/ml)	Canine serum type				p-Value*
	Controls (n = 7)	HBMT (n = 10)	Non-IMC MMT (n = 24)	IMC (n = 7)	
IL-1 α	8.61 \pm 0.76 ^a	13.35 \pm 1.31 ^a	31.07 \pm 4.54 ^b	31.93 \pm 3.82 ^b	0.005
IL-1 β	19.09 \pm 2.67 ^a	25.19 \pm 5.09 ^a	34.33 \pm 6.11 ^a	28.18 \pm 3.46 ^a	0.469
IL-6	4.96 \pm 0.77 ^a	17.09 \pm 2.36 ^b	12.29 \pm 1.63 ^{a,b}	13.25 \pm 1.11 ^b	0.023
IL-8	15.12 \pm 2.4 ^a	25.41 \pm 4.55 ^a	101.78 \pm 8.84 ^b	139.96 \pm 14.46 ^c	0.000
IL-10	43.10 \pm 5.91 ^a	47.77 \pm 14.98 ^a	74.75 \pm 10.25 ^a	131.15 \pm 13.43 ^b	0.043

Values with distinct superscript letters (a–c) denoting statistical differences (p-value < 0.05) among groups using Duncan test.

* ANOVA test (p-value < 0.05).

inflammation, since tissue inflammation does not differ between inflammatory and non-inflammatory samples (Peña et al., 2003).

In tumor homogenates, only IL-10 was significantly increased in IMC cases versus non-IMC MMTs. Levels of IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 in IMC and non-IMC MMT tumor homogenates were similar in both groups, which is in accordance with similar results of IL-1 α , IL-1 β and IL-8 found in human IBC and non IBC samples (Bieche et al., 2004). To the best of our knowledge, this is the first report that assesses IL-10 in canine mammary tumors. The increase of IL-10 tissue levels found in IMC seems to indicate an important participation of IL-10 in the pathogenesis of IMC. Interleukin-10 is primarily a potent anti-inflammatory cytokine that inhibits gene expression and T cell/macrophage cytokine synthesis and inhibits their antigen-presenting capacity, therefore it suppresses the production of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10 itself by inflammatory cells (Moore et al., 1993). Increased levels of tissue IL-10 levels might explain the reported similar amount of tumor associated inflammation between malignant non-IMC and IMC in spite of the fact that inflammatory infiltrate is increased with malignancy in CMTs, and IMC is considered the most malignant canine mammary cancer (Peña et al., 2003). On the contrary, some differences found between the ILs levels of normal mammary gland versus tumors and between benign versus malignant tumors could be partially attributed to a higher tumor-associated inflammation.

Interleukin-10 serum levels in dogs with IMC were also significantly increased; this is in agreement with high IL-10 serum levels reported in women with metastatic breast cancer (Merendino et al., 1996), since all but one of the canine IMC cases studied had distant metastases.

Interleukin-10 production has been related to chronic infection with Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) (Papiernik et al., 1997), which has 85% to 95% homology to the Human Mammary Tumor Virus (HMTV) (Pogo et al., 2010). Interestingly, the viral etiology of IBC and its implication on the epidemiology of the disease is a hot topic under research. The participation of HMTV (Levine et al., 1984; Pogo et al., 2010) and MMTV (Arias-Pulido, 2012; Levine, 2012) has been postulated in the etiopathogenesis of human IBC. Further investigations on the detection of viral particles in canine IMC samples and its relation with IL-10 levels would clarify this point.

Our study showed higher IL-8 serum levels in the IMC group than in the others. In human experimental IBC mouse xenograft, Shirakawa et al. (2001) found significantly higher levels of human IL-8 in murine sera compared with IL-8 levels from a non-IBC mouse xenograft. High levels of IL-8 have been also demonstrated in conditioned SUM149 IBC cell line media, which suggests IL-8 production by tumor cells (Van Golen et al., 2000). Our results in canine serum confirm the participation of IL-8 also in canine spontaneous IMC. The high levels of IL-8 found in IBC and IMC could be associated with the exacerbated angiogenesis that is characteristic of this type of mammary cancer, since IL-8 is considered an angiogenic stimulator (Zlotnik and Yoshie, 2000; Lin et al., 2004). IL-8 serum levels correlate also to poor prognosis and metastasis in human breast cancer (Benoy et al., 2004; Derin et al., 2007) and could be also a plausible explanation for the increase of serum IL-8 in our IMC cases, most of them metastatic, and the increase of IL-8 in the serum of dogs with non-IMC MMTs respect to dogs with benign mammary growths and controls. The increase of IL-8 in canine mammary tumors with clinical malignancy has been recently indicated (Gelaleti et al., 2012), proposing IL-8 as a prognostic serum marker for disease progression and tumor recurrence. Controversially, the same group had indicated previously that tissue IL-8 diminishes in malignant CMTs respect to normal mammary gland by immunohistochemistry and PCR, being this expression positively associated with longer survivals and suggesting that tissue IL-8 could play a protective role against canine mammary tumor progression (Zuccari et al., 2011).

On the contrary, our results reveal that IL-8 in tissue is elevated from normal mammary gland to tumors, increasing with malignancy (see Table 2) as occurred with the serum levels, although the differences among the groups in tumor homogenates were not significant. The lack of statistical significance in the increased levels of tissue IL-8 in IMC versus non-IMC MMT is probably due to the reduced number of IMC cases included in this study; this interesting point deserves further investigations including more cases and immunohistochemistry. On the other hand, our results are not fully comparable with those of Zuccari et al. (2011): our study included only grade III malignant mammary tumors, while the others analyzed 5 benign mammary tumors, grade I and II malignant mammary tumors and only one malignant tumor grade III.

Interleukin-6 levels in tumor homogenates were higher in malignant tumors (IMC and non-IMC MMT) versus HBMT. This is in accordance with previous results demonstrating that IL-6 immunohistochemical expression was higher in malignant CMTs compared with benign CMTs (Kim et al., 2010), although it was not associated to metastases, as previously reported (Kim et al., 2010). Taking into account that tumor cells can produce IL-6 as an autocrine growth factor (Angelo and Kurzrock, 2007), our result confirm that IL-6 is associated with tumor malignancy in CMTs and may play a critical role in tumor growth.

The results of this study are limited by the relative small number of samples included, especially of IMC cases. IMC is a rare clinicopathological entity that is usually studied by means of retrospective studies due to its low prevalence. The nature of sampling of the present study required a prospective study and, therefore, we obtained a low number of IMC cases. Nevertheless, the significant statistical differences found in IMC cases versus non-IMC MMTs are robust as preliminary results, and may indicate differences in the pathogenic mechanism in IMC that could be useful for diagnostic purposes or for the possible development of new therapies.

5. Conclusion

To our knowledge, this is the first report that investigates the content of ILs in IMC and IL-10 in CMTs. In spite of the fact that few are the data published regarding ILs levels in human IBC, some results of this study are in agreement. Therefore, these results help to support the validity of the canine model of human IBC and provide insight into this uncommon malignancy in dogs.

The number of IMC cases included in this study, after a period of 2 years of prospective sampling, is low to make substantial conclusions and the results obtained should be considered as preliminary data to be confirmed with a larger series of IMC cases.

Our results indicate a role for IL-6, IL-8 and IL-10 in canine mammary malignancy and specific differences in ILs content in IMC versus non-IMC MMT that could have future diagnostic and therapeutic implications. IL-8 and IL-10 have specific difference levels related to the “inflammatory” phenotype and might have important roles in this distinct type of mammary cancer, but future studies concerning the localization of ILs at cellular level and comparison with angiogenic characteristics are necessary to better understand the role of these cytokines in IMC pathogenesis and to investigate new therapies that could diminish the lethal impact of this disease in women and female dogs.

Conflict of interest

The authors declare they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Education (research project no. SAF

2009-10572 and PhD fellowship). We are grateful to Pedro Aranda for his histological technical assistance.

References

- Angelo, L.S., Kurzrock, R., 2007. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin. Cancer Res.* 13, 2825–2830.
- Apte, R.N., Krelm, Y., Song, X., Dotan, S., Recih, E., Elkabets, M., Carmi, Y., Dvorkin, T., White, R.M., Gayvoronsky, L., Segal, S., Voronov, E., 2006. Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour–host interactions. *Eur. J. Cancer* 42, 751–759.
- Arias-Pulido, H., 2012. Incidence of mouse mammary tumor virus-like variant sequences in inflammatory breast cancer. In: *Third International Inflammatory Breast Cancer Conference*, Philadelphia, USA, December, pp. 1–2.
- Arihiro, K., Oda, H., Kaneko, M., Inai, K., 2000. Cytokines facilitate chemotactic motility of breast carcinoma cells. *Breast Cancer* 7, 221–230.
- Asgeirsson, K.S., Olafsdottir, K., Jonasson, J.G., Ogmundsdottir, H.M., 1998. The effects of IL-6 on cell adhesion and E-cadherin expression in breast cancer. *Cytokine* 10, 720–728.
- Bachelot, T., Ray-Coquard, I., Menetrier-Caux, C., Rastkha, M., Duc, A., Blay, J.Y., 2003. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *Br. J. Cancer* 88, 1721–1726.
- Benoy, I.H., Salgado, R., Van Dam, P., Geboers, K., Van Marck, E., Scharpe, S., Vermeulen, P.B., Dirix, L.Y., 2004. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin. Cancer Res.* 10, 7157–7162.
- Bieche, I., Lerebours, F., Tozlu, S., Espie, M., Marty, M., Lidereau, R., 2004. Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. *Clin. Cancer Res.* 10, 6789–6795.
- Clemente, M., De Andrés, P.J., Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., 2009. Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. *Vet. Rec.* 165, 78–81.
- Clemente, M., Pérez-Alenza, M.D., Illera, J.C., Peña, L., 2010. Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet. Pathol.* 47, 265–274.
- Coico, R., Sunshine, G., Benjamini, E., 2003. In: Coico, R., Sunshine, G., Benjamini, E. (Eds.), *Immunology: A Short Course*, vol. xxv, 5th ed. Wiley-Liss, Hoboken, NJ, Chichester, 361 pp.
- Charafe-Jauffret, E., Mrad, K., Intidhar Labidi, S., Ben Hamida, A., Ben Romdhane, K., Ben Abdallah, M., Ginestier, C., Esterni, B., Birnbaum, D., Ben Ayed, F., Xerri, L., Viens, P., Mezlini, A., Jacquemier, J., 2007. Inflammatory breast cancers in Tunisia and France show similar immunophenotypes. *Breast* 16, 352–358.
- Chavey, C., Bibeau, F., Gourgou-Bourgade, S., Burlincho, S., Boissiere, F., Laune, D., Roques, S., Lazennec, G., 2007. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res.* 9, R15.
- de M. Souza, C.H., Toledo-Piza, E., Amorin, R., Barboza, A., Tobias, K.M., 2009. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Can. Vet. J.* 50, 506–510.
- Derin, D., Soydu, H.O., Guney, N., Tas, F., Camlica, H., Duranyildiz, D., Yasasever, V., Topuz, E., 2007. Serum IL-8 and IL-12 levels in breast cancer. *Med. Oncol.* 24, 163–168.
- Freund, A., Chauveau, C., Brouillet, J.P., Lucas, A., Lacroix, M., Licznar, A., Vignon, F., Lazennec, G., 2003. IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene* 22, 256–265.
- Gelaleti, G.B., Jardim, B.V., Leonel, C., Moschetta, M.G., Zuccari, D.A., 2012. Interleukin-8 as a prognostic serum marker in canine mammary gland neoplasias. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 146, 106–112.
- Gonzalez-Angulo, A.M., Hennessy, B.T., Broglio, K., Meric-Bernstam, F., Cristofanilli, M., Giordano, S.H., Buchholz, T.A., Sahin, A., Singletary, S.E., Buzdar, A.U., Hortobagyi, G.N., 2007. Trends for inflammatory breast cancer: is survival improving? *Oncologist* 12, 904–912.
- Haagensen, C.D., 1956. *Inflammatory Carcinoma*. Saunders, Philadelphia.
- Illera, J.C., Pérez-Alenza, M.D., Nieto, A., Jimenez, M.A., Silvan, G., Dunner, S., Peña, L., 2006. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids* 71, 541–548.
- Jaiyesimi, I.A., Buzdar, A.U., Hortobagyi, G., 1992. Inflammatory breast cancer: a review. *J. Clin. Oncol.* 10, 1014–1024.

- Khong, H.T., Restifo, N.P., 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of tumor escape" phenotypes. *Nat. Immunol.* 3, 999–1005.
- Kim, J.H., Yu, C.H., Yhee, J.Y., Im, K.S., Sur, J.H., 2010. Lymphocyte infiltration, expression of interleukin (IL)-1, IL-6 and expression of mutated breast cancer susceptibility gene-1 correlate with malignancy of canine mammary tumours. *J. Comp. Pathol.* 142, 177–186.
- Knupfer, H., Preiss, R., 2007. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Res. Treat.* 102, 129–135.
- Kobayashi, H., Shirakawa, K., Kawamoto, S., Saga, T., Sato, N., Hiraga, A., Watanabe, I., Heike, Y., Togashi, K., Konishi, J., Brechbiel, M.W., Wakasugi, H., 2002. Rapid accumulation and internalization of radiolabeled hereceptin in an inflammatory breast cancer xenograft with vasculogenic mimicry predicted by the contrast-enhanced dynamic MRI with the macromolecular contrast agent G6-(1B4M-Gd)(256). *Cancer Res.* 62, 860–866.
- Kozłowski, L., Zakrzewska, I., Tokajuk, P., Wojtukiewicz, M.Z., 2003. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz. Akad. Med. Białymst.* 48, 82–84.
- Lana, S.E., Rutteman, G.R., Withrow, S.J., 2007. Tumors of the mammary gland. In: Withrow, S.J., Vail, D.M. (Eds.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 619–636.
- Lee, B.J., Tannenbaum, E., 1924. Inflammatory carcinoma of the breast. *Surg. Gynecol. Obstet.* 39, 580.
- Levine, P., 2012. Current epidemiologic studies: advances and obstacles. In: *Third International Inflammatory Breast Cancer Conference*, Philadelphia, USA, December 1–2.
- Levine, P.H., Mesa-Tejada, R., Keydar, I., Tabbane, F., Spiegelman, S., Mourali, N., 1984. Increased incidence of mouse mammary tumor virus-related antigen in Tunisian patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* 33, 305–308.
- Lewis, A.M., Varghese, S., Xu, H., Alexander, H.R., 2006. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J. Transl. Med.* 4, 48.
- Li, J., Perrella, M.A., Tsai, J.C., Yet, S.F., Hsieh, C.M., Yoshizumi, M., Patterson, C., Endege, W.O., Zhou, F., Lee, M.E., 1995. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 270, 308–312.
- Lin, Y., Huang, R., Chen, L., Li, S., Shi, Q., Jordan, C., Huang, R.P., 2004. Identification of interleukin-8 as estrogen receptor-regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays. *Int. J. Cancer* 109, 507–515.
- Lyon, D.E., McCain, N.L., Walter, J., Schubert, C., 2008. Cytokine comparisons between women with breast cancer and women with a negative breast biopsy. *Nurs. Res.* 57, 51–58.
- Marconato, L., Romanelli, G., Stefanello, D., Giacoboni, C., Bonfanti, U., Bettini, G., Finotello, R., Verganti, S., Valenti, P., Ciaramella, L., Zini, E., 2009. Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003–2008). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 235, 967–972.
- Merendino, R.A., Arena, A., Capozza, A.B., Chillemi, S., Mesiti, M., 1996. Serum levels of interleukin-10 in patients affected by breast cancer. *Immunol. Lett.* 53, 59–60.
- Mettler, L., Salmassi, A., Heyer, M., Schmutz, A., Schollmeyer, T., Jonat, W., 2004. Perioperative levels of interleukin-1beta and interleukin-6 in women with breast cancer. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 31, 20–22.
- Millanta, F., Caneschi, V., Ressel, L., Citi, S., Poli, A., 2010. Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and non-inflammatory mammary carcinoma. *J. Comp. Pathol.* 142, 36–42.
- Misdorp, W., Else, R.W., Hellmen, E., Lipscomb, T.P., 1999. *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat*. World Human Organization VII.
- Moore, K.W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P., Mosmann, T.R., 1993. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 165–190.
- Papiernik, M., do Carmo Leite-de-Moraes, M., Pontoux, C., Joret, A.M., Rocha, B., Penit, C., Dy, M., 1997. T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL-10-producing T cell population with infectious capacity. *J. Immunol.* 158, 4642–4653.
- Peña, L., De Andrés, P.J., Clemente, M., Cuesta, P., Pérez-Alenza, M.D., 2012. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet. Pathol.* <http://dx.doi.org/10.1177/0300985812447830>.
- Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., Rodríguez-Bertos, A., Nieto, A., 2003. Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res. Treat.* 78, 141–148.
- Pérez-Alenza, M.D., Tabanera, E., Peña, L., 2001. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995–1999). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 1110–1114.
- Pogo, B.G., Holland, J.F., Levine, P.H., 2010. Human mammary tumor virus in inflammatory breast cancer. *Cancer* 116, 2741–2744.
- Purohit, A., Newman, S.P., Reed, M.J., 2002. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 4, 65–69.
- Queiroga, F.L., Pérez-Alenza, M.D., Silván, G., Peña, L., Lopes, C., Illera, J.C., 2005. Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Res.* 25, 4269–4275.
- Reed, M.J., Coldham, N.G., Patel, S.R., Ghilchik, M.W., James, V.H., 1992. Interleukin-1 and interleukin-6 in breast cyst fluid: their role in regulating aromatase activity in breast cancer cells. *J. Endocrinol.* 132, R5–R8.
- Sánchez-Archidona, A.R., Jiménez, M.A., Pérez-Alenza, D., Silván, G., Illera, J.C., Peña, L., Dunner, S., 2007. Steroid pathway and oestrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 104, 93–99.
- Shirakawa, K., Furuhashi, S., Watanabe, I., Hayase, H., Shimizu, A., Ikarashi, Y., Yoshida, T., Terada, M., Hashimoto, D., Wakasugi, H., 2002a. Induction of vasculogenesis in breast cancer models. *Br. J. Cancer* 87, 1454–1461.
- Shirakawa, K., Kobayashi, H., Heike, Y., Kawamoto, S., Brechbiel, M.W., Kasumi, F., Iwanaga, T., Konishi, F., Terada, M., Wakasugi, H., 2002b. Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res.* 62, 560–566.
- Shirakawa, K., Kobayashi, H., Sobajima, J., Hashimoto, D., Shimizu, A., Wakasugi, H., 2003. Inflammatory breast cancer: vasculogenic mimicry and its hemodynamics of an inflammatory breast cancer xenograft model. *Breast Cancer Res.* 5, 136–139.
- Shirakawa, K., Tsuda, H., Heike, Y., Kato, K., Asada, R., Inomata, M., Sasaki, H., Kasumi, F., Yoshimoto, M., Iwanaga, T., Konishi, F., Terada, M., Wakasugi, H., 2001. Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer. *Cancer Res.* 61, 445–451.
- Shirakawa, K., Wakasugi, H., Heike, Y., Watanabe, I., Yamada, S., Saito, K., Konishi, F., 2002c. Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int. J. Cancer* 99, 821–828.
- Susaneck, S.J., Allen, T., Hoopes, J., Withrow, S.J., Macy, D.W., 1983. Inflammatory mammary carcinoma in the dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 19, 971–976.
- Tavassoli, F.A., 1999. *Pathology of the Breast*, vol. XIV., 2nd ed. McGraw-Hill, New York, 874 pp.
- Van Golen, K.L., Wu, Z.F., Qiao, X.T., Bao, L., Merajver, S.D., 2000. RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells. *Neoplasia* 2, 418–425.
- Verhasselt, B., Van Damme, J., van Larebeke, N., Put, W., Bracke, M., De Potter, C., Mareel, M., 1992. Interleukin-1 is a motility factor for human breast carcinoma cells in vitro: additive effect with interleukin-6. *Eur. J. Cell Biol.* 59, 449–457.
- Wilson, J., Balkwill, F., 2002. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* 12, 113–120.
- Zlotnik, A., Yoshie, O., 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121–127.
- Zuccari, D.A., Castro, R., Gelaleti, G.B., Mancini, U.M., 2011. Interleukin-8 expression associated with canine mammary tumors. *Genet. Mol. Res.* 10, 1522–1532.

